

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**Estudio comparativo del perfil electroforético del plasma seminal
de semen fresco de *Vicugna pacos* “alpaca” en dos épocas del año y
su relación con los parámetros de calidad seminal. Ayacucho, 2023**

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGA, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Kattery Rossabel CORDERO RUA

ASESOR:

Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA

COASESOR:

Mg. Mijaíl CONTRERAS HUAMANÍ

AYACUCHO - PERÚ

2024

*Con todo mi amor y admiración a
mis padres Carlos y Cleide, y a
mi hermana Leidy Carla.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en especial a la Escuela Profesional de Biología y el Área Académica de Biotecnología por la formación profesional.

Al Vicerrectorado de Investigación, por el financiamiento con recursos del FOCAM del proyecto: Marcadores proteicos del plasma seminal de alpaca asociados a viscosidad y congelabilidad del semen en dos condiciones nutricionales y climáticas y su relación con los parámetros de calidad espermática, aprobado por Resolución del Consejo Universitario N° 005-2022-UNSCH-CU.

A la Estación Experimental Agraria Canaán – INIA Ayacucho, en especial al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva por permitirme hacer uso de sus herramientas y material genético para la ejecución de la presente investigación.

Al Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, mi asesor de tesis y al Mg. Mijaíl Contreras Huamaní co-asesor, por su asesoramiento durante toda la ejecución de la tesis.

A la Dra. Silvana Apichela de la Universidad Nacional de Tucumán – Argentina y al Dr. Fabian Rueda de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) – Colombia, por su guía para el análisis de datos.

A mis padres Carlos Cordero y Cleide Rua, y a mi hermana Leydi Carla por su amor y apoyo constante durante toda mi vida.

A mis compañeros del proyecto: Harumi, Crissthel, Alexander y Kevin, por todo su apoyo.

A cada persona que con palabras de aliento me motivaron a continuar con la investigación.

A los pastores de centros alpaqueros que nos acogieron y por tan valiosa labor.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	Pág. iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE TABLAS	vi
ÍNDICE FIGURAS	vii
ÍNDICE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Antecedentes	12
2.2. <i>Vicugna pacos</i> (“alpaca”)	13
2.3. Fisiología reproductiva de la alpaca macho	13
2.4. Semen de la alpaca	15
2.4.1. Morfología y morfometría del espermatozoide	15
2.4.2. Parámetros de calidad espermática	15
2.4.3. Métodos de recolección de semen	21
2.5. Plasma seminal de alpaca	22
2.5.1. Características del plasma seminal	22
2.5.2. Proteínas del plasma seminal	23
2.5.3. Influencia de la estacionalidad en las proteínas del plasma seminal	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Lugar de estudio	27
3.2. Población y muestra	28
3.3. Metodología	28
3.3.1. Obtención de muestra seminal	28
3.3.2. Análisis macroscópico	29
3.3.3. Análisis microscópico	31
3.3.4. Obtención del plasma seminal	35
3.3.5. Cuantificación de proteínas	35
3.3.6. Electroforesis sds-page unidimensional	37
3.3.7. Análisis estadístico	40
IV. RESULTADOS	41

4.1.	Análisis de calidad seminal	41
4.1.1.	Calidad seminal en época de secano	41
4.1.2.	Calidad seminal en época de lluvias	42
4.1.3.	Comparación de calidad seminal en época de secano y lluvias	43
4.2.	Análisis de proteínas en el plasma seminal	45
4.2.1.	Concentración total de proteína en época de secano y lluvias	45
4.2.2.	Número y frecuencia de proteínas expresadas en época de secano	46
4.2.3.	Número y frecuencia de proteínas expresadas en época de lluvias	48
4.2.4.	Concentración relativa de proteínas en época de secano y lluvias	50
4.3.	Análisis de la correlación de proteínas del plasma seminal y la calidad seminal en ambas épocas	53
V.	DISCUSIONES	64
5.1.	Análisis de calidad seminal	64
5.2.	Análisis de proteínas en el plasma	66
VI.	CONCLUSIONES	70
VII.	RECOMENDACIONES	71
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	ANEXOS	81

ÍNDICE TABLAS

	Pág.
1. Calidad seminal en época de secano	49
2. Calidad seminal en época de lluvias	50
3. Comparación de calidad seminal en época de secano y lluvias	51
4. Comparación de calidad seminal individual en ambas épocas	52
5. Comparación de concentración total de proteínas en ambas épocas	53
6. Perfil electroforético 1D-SDS-PAGE en época de secano	55
7. Perfil electroforético 1D-SDS-PAGE en época de lluvias	57
8. Concentración relativa de proteínas en época de secano y lluvias	58
9. Concentración relativa de proteínas individual en ambas épocas	59
10. Correlación entre proteínas y calidad seminal en ambas épocas	61

ÍNDICE FIGURAS

	Pág.
1. Fisiología del tracto reproductivo de la alpaca macho	21
2. Morfometría del espermatozoide	25
3. Evaluación de espermatozoides con la técnica <i>HOST</i>	26
4. Evaluación de espermatozoides con la técnica <i>FITC-PNA</i>	27
5. Diagrama ilustrativa de la vagina artificial	37
6. Diagrama ilustrativo de medición de filancia seminal	38
7. Evaluación de integridad de membrana de espermatozoides	40
8. Representación gráfica de evaluación de funcionalidad de membrana espermático	41
9. Evaluación de funcionalidad de membrana e integridad acrosomal de espermatozoides	42
10. Escala colorimétrica visual de la curva de calibración con albúmina	44
11. Línea de tendencia de la curva de calibración con albúmina	44
12. Electroforesis 1D-SDS-PAGE	47
13. Electroforegrama 1D-SDS-PAGE en época de secano	54
14. Electroforegrama 1D-SDS-PAGE en época de lluvias	56
15. Correlación de la banda 73.5 kDa con la filancia en época de secano	62
16. Correlación de la banda 66.9 kDa con la integridad de membrana en época de secano	63
17. Correlación de la banda 36.3 kDa con la funcionalidad de membrana en época de secano	64
18. Correlación de la banda 29.6 kDa con la integridad de membrana en época de secano	65
19. Correlación de la banda 10.2 kDa con la integridad de membrana en época de secano	66
20. Correlación de la banda 50.4 kDa con la integridad de membrana en época de lluvias	67
21. Correlación de la banda 42.3 kDa con la movilidad en época de lluvias	68
22. Correlación de la banda 10.2 kDa con la filancia en época de lluvias	69
23. Correlación de la banda 10.2 kDa con la integridad acrosomal en época de lluvias	70
24. Correlación de la banda 6.3 kDa con la integridad acrosomal en época de lluvias	71

ÍNDICE ANEXOS

1. Registro total de datos meteorológicos	93
2. Registro total de calidad seminal en época de secano	94
3. Registro total de calidad seminal en época de lluvias	95
4. Registro de datos de concentración total de proteínas	96
5. Registro de datos de los pesos moleculares en época de secano	97
6. Registro de datos de los pesos moleculares en época de lluvias	98
7. Correlación de Pearson de calidad seminal y proteínas en época de secano	99
8. Correlación de Pearson de calidad seminal y proteínas en época de lluvias	100
9. Registro fotográfico del entrenamiento de alpacas	101
10. Registro fotográfico de colección de semen	102
11. Registro fotográfico de evaluación de calidad seminal	103
12. Registro fotográfico de cuantificación de proteínas	104
13. Registro fotográfico de preparación de geles	105
14. Registro fotográfico de preparación de muestras para electroforesis	105
15. Registro fotográfico electroforesis 1D-SDS-PAGE	106
16. Registro fotográfico de análisis de geles	107
17. Registro fotográfico de equipo de investigación	108
18. Matriz de consistencia	109

RESUMEN

La reproducción de alpacas mediante procesos biotecnológicos es una problemática actual debido a la baja calidad del semen vinculado a su alta viscosidad, no obstante, estos problemas podrían estar relacionadas a su vez con proteínas específicas del plasma seminal y condicionado a factores externos. El objetivo del presente trabajo fue comparar el perfil electroforético unidimensional del plasma seminal de alpaca en dos épocas del año (secano y lluvia) y determinar la relación con los parámetros de calidad seminal. Se evaluaron 8 alpacas macho en edad reproductiva ($n=8$), previamente entrenadas y seleccionadas, se mantuvieron en condiciones de semi-estabulación a 2,746 msnm. Las muestras de semen fueron colectadas con vagina artificial acoplada a un maniquí. Los parámetros de calidad evaluados fueron la filancia, motilidad, integridad de membrana, funcionalidad de la membrana e integridad acrosomal del semen fresco. Posteriormente, el plasma seminal fue obtenido por centrifugación a $10\,000 \times g$ por 20 min dos veces y se determinó la cantidad de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con la prueba de Bradford. La electroforesis SDS-PAGE se realizó en gel de separación al 15% y se cargó 60 μg de proteína en cada pocillo. Los geles fueron fotodocumentados en un equipo GelDoc Go (Bio-Rad) y las imágenes fueron analizadas con el programa Image Lab 6,1. Se realizaron las pruebas de ANOVA, T de student para muestras emparejadas y correlación de Pearson en el programa SPSS para el análisis de los datos. Los resultados mostraron que no hay diferencia significativa ($p>0,05$) entre la calidad seminal de la época de secano y lluvioso; sin embargo, la concentración de las proteínas de 29,61 kDa; 10,17 kDa y 10,23 kDa sí varía en ambas estaciones. Se encontró una correlación negativa significativa ($p<0,05$) entre las bandas de 73,48 kDa y el parámetro de filancia; las bandas 66,92 kDa y 29,61 kDa con la integridad de membrana; la banda 36,32 kDa con la funcionalidad de membrana y las bandas 10,17 kDa y 6,28 kDa con la integridad acrosomal. Además, se encontró una correlación positiva significativa ($p<0,01$) de las bandas 50,44 kDa y 10,17 kDa con la integridad acrosomal y filancia, respectivamente, así como la banda 42,27 kDa con la movilidad ($p<0,05$). Se concluye que existe correlación entre algunas proteínas y parámetros de calidad seminal, las cuales podrían actuar como marcadores proteicos

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el Perú mantiene la mayor población de alpacas, con alrededor de 3,7 millones de ejemplares, siendo Ayacucho la región que alberga el 2,8% de la población; para algunas regiones altoandinas la principal fuente de ingreso económico es la producción de camélidos sudamericanos, principalmente el alto valor de la fibra de alpaca que representa el 80% de la producción total a nivel mundial (MINAGRI, 2018). Sin embargo, las poblaciones alpaqueras presentan múltiples problemas reproductivos relacionados a la fisiología seminal, la cual está vinculada con la alta viscosidad y bajo volumen seminal, baja concentración y movilidad espermática, que impiden la aplicación de biotecnologías reproductivas como criopreservación seminal e inseminación artificial para el mejoramiento genético (Contreras et al., 2024; Garnica et al., 1993; Huanca et al., 2011; Morton et al., 2008).

Asimismo, diversos componentes, en especial las proteínas del plasma seminal cumplen una función importante en el transporte, supervivencia y capacidad de fertilización de los espermatozoides (Druart & de Graaf, 2018; Rodríguez et al., 2011); en las alpacas, se reportó la mucina 5B como la proteína responsable de la viscosidad seminal (Kershaw-Young & Maxwell, 2012), la proteína RSVP14 que cumplen con la función de protección y transporte de los espermatozoides (Druart et al., 2013), y la proteína Factor de Inducción para la Ovulación (α -NGF) que induce la ovulación en el tracto genital femenino (Aisen et al., 2021; Kershaw-Young, Druart, et al., 2012; Kumar et al., 2013); no obstante, aún no se realizó una caracterización completa de las proteínas presentes en plasma seminal y su relación con los parámetros de calidad seminal que pueden actuar como marcadores proteicos.

Por otro lado, factores externos como la estacionalidad pueden afectar algunos parámetros de la calidad seminal como la concentración y morfología espermática (Giuliano et al., 2008; Lima Verde et al., 2020); sin embargo, aún no se reportó el efecto que podría haber sobre la composición proteica del plasma seminal de alpaca, es por ello que los objetivos del presente estudio son los siguientes:

Objetivo general

Comparar el perfil electroforético del plasma seminal de alpaca en dos épocas del año y relacionarlo con los parámetros de calidad seminal.

Objetivos específicos

1. Evaluar los parámetros de calidad seminal (filancia, movilidad, integridad de membrana, funcionalidad de la membrana e integridad del acrosoma) del semen fresco de alpaca en época de secano y lluvias.
2. Determinar la concentración total de proteínas del plasma seminal de alpaca en época de secano y lluvias.
3. Realizar el perfil electroforético de proteínas del plasma seminal de alpaca en época de secano y lluvias.
4. Correlacionar los parámetros de calidad seminal con el perfil electroforético del plasma seminal en época de secano y lluvias.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El plasma seminal es de esencial importancia para el transporte, supervivencia y capacidad de fertilización de los espermatozoides en el tracto genital femenino, y estas funciones dependen de los azúcares, lípidos y proteínas que lo componen. Las proteínas, en particular, participan en pasos esenciales que preceden la fertilización e interacción de gametos; curiosamente, además, son específicas de cada especie y se diferencian en su estructura, abundancia relativa y patrones de expresión (Druart & de Graaf, 2018).

En mamíferos se han descrito una variedad de proteínas que forman parte del plasma seminal e interactúan con los espermatozoides, tales como los bovinos, en el que se reportaron aproximadamente 1 974 proteínas del plasma seminal entre 10 a 250 kDa (siendo las predominantes de 30 kDa), de las cuales 952 proteínas son comunes también en los espermatozoides (Ramesha et al., 2020; Sarsaifi et al., 2015). Mientras que en carneros, se ha identificado 727 proteínas que se encontraban de manera desproporcionada en el plasma seminal, siendo solo el 5% de ellas las que representaban el 50% de espectro total (Soleilhavoup et al., 2014), otro trabajo reportó también un total de 362 proteínas involucradas con la capacidad de congelación del plasma seminal (Rickard et al., 2015).

En la alpaca, aún no se reportaron proteínas específicas relacionadas a la calidad seminal o procesos de criopreservación; sin embargo, se reportó que la concentración total de proteínas no se ve alterado en procesos de congelación/descongelación (Díaz, 2014). Por otro lado, la proteína Factor de Inducción para la Ovulación (OIF/□-NGF) de 14 kDa se encuentra muy estudiada

debido a su alta expresión, representando un 47% de la cantidad total de proteínas en el plasma seminal, ya que induce la ovulación en el genital femenino, siendo una peculiaridad en la fisiología reproductiva de camélidos (Druart et al., 2013; Kershaw-Young, Druart, et al., 2012). Asimismo, Aisen et al. (2021), realizó el perfil electroforético SDS-PAGE unidimensional del plasma seminal de alpaca y reportó 5 bandas de proteínas de distintos pesos moleculares; mientras que Kershaw-Young & Maxwell (2012), mediante espectrometría de masas identificó 28 proteínas, donde se sugiere que la mucina 5B, mucina 5AC y la apomucina son formadoras de gel y por lo tanto de la viscosidad seminal; no obstante, aún no se encuentra estudiado la influencia que puede causar el cambio de estacionalidad en las proteínas del plasma seminal y su relación con otros parámetros de calidad espermática, es por eso que este trabajo colaborará para elucidar dichos conocimientos.

2.2. *Vicugna pacos* “alpaca”

La alpaca es un Camélido Sudamericano domesticado, genéticamente descende de *Lama vicugna* “vicuña” y en menor proporción de *Lama glama* “llama”, inicialmente era considerada sucesora de *Lama guanicoe* “guanaco”, por ello su primera denominación fue *Lama pacos*, sin embargo, a través de estudios moleculares pudo demostrarse que existe una relación estrecha entre la alpaca y la vicuña, siendo su denominación actual *Vicugna pacos* (Kadwell et al., 2001).

En esta especie se puede diferenciar dos razas que difieren, en apariencia, la raza Huacaya por tener una fibra corta y rizada, y Suri que posee una fibra larga y recta (Bustinza et al., 2021); en el Perú, el 80% de alpacas son de la raza Huacaya, 12% Suri y 8% de razas híbridas (MINAGRI, 2018).

2.3. Fisiología reproductiva de la alpaca macho

El inicio de la edad de reproductiva de la alpaca es entre los 2 y 3 años de edad, cuando desaparece la adherencia pene – prepucio (Huanca, 1996; Sumar, 1983). El pene de la alpaca es de tipo fibroelástico que puede llegar a medir de 35 a 40 cm en erección, presente la “S” peniana delante de los testículos, los cuales son de 3,5 a 5 cm de largo en un animal mayor a 3 años, equivalente a 0,02 – 0,03% del peso total de cuerpo. Las alpacas carecen de vesículas seminales, las principales glándulas

sexuales son la próstata y las glándulas bulbouretrales, están producen secreciones que dan volumen al semen (Huanca, 1996; Vaughan et al., 2003).

La producción de espermatozoides comprende de tres fases, primero la espermatocitogénesis, en el cual las células germinales primordiales cambian a espermatídes; la segunda fase es la espermiogénesis, en el que los espermatídes esféricos son transformados a espermatozoides, y finalmente la espermiación, en el que los espermatozoides son liberados dentro de los tubos seminíferos; todo este proceso está regulado por las hormonas como la liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) que provocan la producción de andrógenos para la formación y maduración espermática (Hafez & Hafez, 2000).

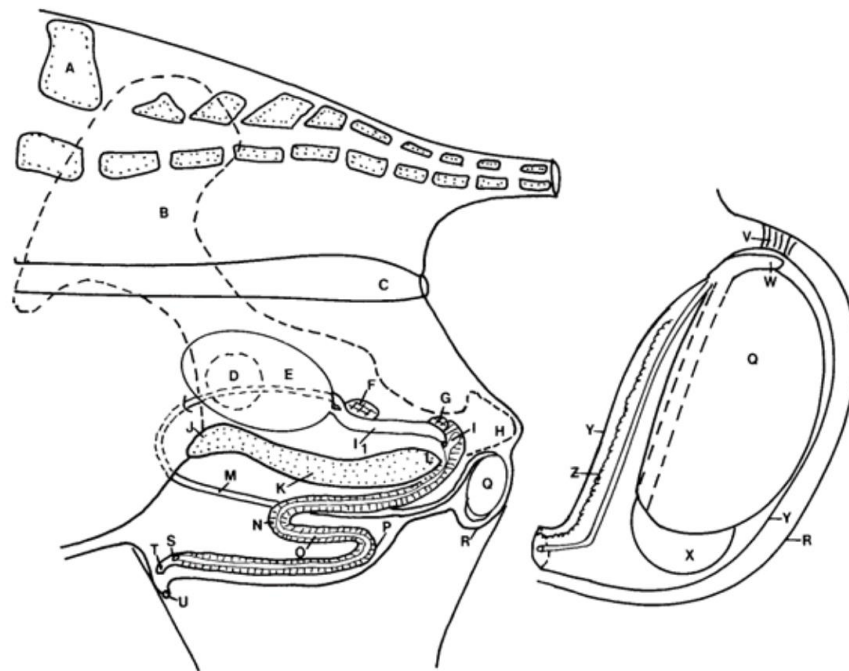


Figura 1. Vista lateral de los genitales masculinos de camélidos: A) columna espinal, B) íleon, C) recto, D) acetábulo, E) vejiga, F) glándula prostática, G) glándula bulbouretral, H) tuberosidad isquiática, I) uretral dorsal, J) borde de la pelvis, K) hueso púbico, L) arco isquiático, M) conducto deferente, N) cuerpo cavernoso del pene, O) uretra peneana, P) glándula sigmoidea del pene, Q) testículo, R) escroto, S) orificio uretral, T) punta cartilaginosa del pene, U) orificio prepucial, V) ligamento escrotal, W) cola del epidídimo, X) cabeza del epidídimo, Y) túnica vaginal, Z) plexo pampiniforme (Fowler, 1998; Vaughan et al., 2003).

2.4. Semen de la alpaca

2.4.1. Morfología y morfometría del espermatozoide

Los espermatozoides son los gametos masculinos producidos por la espermatogénesis, estas células poseen 3 regiones: la cabeza, cuello y flagelo. La cabeza, contiene al núcleo con la información genética y el acrosoma, principalmente; el cuello, es la pieza intermedia que contiene a las mitocondrias y una serie de estructuras laminadas que proveen de flexibilidad al espermatozoide; y el flagelo, que otorga movimiento a la célula. La morfología espermática es variada, sin embargo se las formas normales incluyen a los espermatozoides que tiene cabeza normal y flagelo entero y no enrollado, considerando una longitud de cabeza promedio de 5,47 μm , un ancho de la cabeza promedio de 3,4 μm y una longitud total promedio de 46,03 μm (Gonzales, 2008).

2.4.2. Parámetros de calidad espermática

A. Volumen

Debido a la carencia de vesículas seminales, los camélidos tiene un bajo volumen de eyaculado a comparación de otras especies; en las alpacas el volumen promedio es de 1 a 2 mL (Garnica et al., 1993; Kershaw-Young & Maxwell, 2012; Vaughan et al., 2003). El semen de alpaca presenta un color blanco lechoso al blanco cristalino, dependiente de la concentración espermática el cual constituye un 11,5% y el plasma seminal un 88,5% (Garnica et al., 1993), la concentración de espermatozoides es baja, de 30 – 150 x 10⁶ espermatozoides / mL (Kershaw-Young & Maxwell, 2012). Sin embargo, el volumen de eyaculado y concentración de espermatozoides puede variar entre individuos, debido a sus características fisiológicas propias o en el mismo individuo de una colección a otra, debido al manejo tipo de colección (Garnica et al., 1993; Trujillo, 2019).

B. Filancia

El semen de alpaca es altamente viscoso y puede afectar la motilidad del espermatozoide (Garnica et al., 1993), el cual dificulta las técnicas de reproducción asistida. Algunos estudios muestran que podría ser causado por

glicosaminoglicanos (GAG) que son secretados por las glándulas bulbouretrales, la concentración de GAG en el plasma seminal de alpaca es 15 veces mayor que en el de carnero y más del 85% del contenido total de GAG en el plasma seminal de alpaca es sulfato de queratán y este compuesto está correlacionado con la viscosidad (Kershaw-Young, Evans, et al., 2012); sin embargo, las enzimas que se encargan de la degradación de los GAG no degradan por completo la viscosidad, mientras que las proteasas sí lo logran, lo que sugiere que las proteínas podrían estar relacionadas a la viscosidad en el semen de alpacas (Kershaw-Young et al., 2013). Se reportó que la proteína mucina 5B se encontraba cinco veces más abundante en muestras de plasma seminal de alpaca con alta viscosidad en comparación con aquellas con baja viscosidad (Kershaw-Young & Maxwell, 2012); no obstante, aún no se determina el principal causante de la viscosidad en el semen de alpaca.

C. Movilidad

La movilidad es el parámetro que evalúa el movimiento de los espermatozoides; en el semen de alpaca, no hay movilidad masal y la motilidad individual es oscilante o estacionaria debido al movimiento del espermatozoide en su mismo sitio generado por la contracción por la alta viscosidad del semen (Bravo et al., 2000, 2002; Garnica et al., 1993). La motilidad espermática es un parámetro utilizado generalmente para estimar la calidad seminal en diversas especies; no obstante, en camélidos sudamericanos no sería un buen indicador debido a su predominante movimiento oscilatorio (Bravo et al., 2002).

Para garantizar la fertilización, la motilidad no debe ser menor al 70%; en alpacas, la motilidad varía entre 40% y 90% (Bravo et al., 2002; Linares, 2020; Orellana, 2024). Sin embargo, luego del proceso de criopreservación del semen, la motilidad espermática disminuye entre el 10% a 20% (Morton et al., 2008), obteniéndose una tasa máxima de preñez del 26% a través de inseminación artificial (Vaughan et al., 2003).

La motilidad se mide usualmente de manera subjetiva a través de un microscopio a 400X, en el cual se visualiza espermatozoides móviles en al menos 5 campos y se determina el porcentaje sobre el total de espermatozoides contados; por otro lado, se puede realizar una evaluación más objetiva con el uso de sistemas automatizados como AndroVision sistema CASA (Análisis de Esperma Asistido

por Computadora) que realiza análisis estandarizados de motilidad, concentración y morfología (Mortimer, 2000).

D. Viabilidad

La viabilidad de una célula espermática implica la capacidad de esta para fecundar un ovocito, esto conlleva a realizar técnicas *in vitro* para comprobar, al menos, su unión a la zona pelúcida; sin embargo, comúnmente al usar el término viabilidad hace referencia al porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática y/o acrosomal íntegra (Abecia & Forcada, 2010).

La integridad de la membrana y por lo tanto la funcionalidad, son parámetros esenciales para que un espermatozoide sea móvil, debido a que mantiene concentraciones de iones citoplasmáticos y cofactores fundamentales que son necesarios para el movimiento flagelar del espermatozoide (Leeuw et al., 1991). La evaluación de la integridad de membrana se basa en el uso de fluorocromos combinados como el Ioduro de Propidio (IP) y Hoechst 33342, el IP es un compuesto que atraviesa membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, se une al núcleo y al ser excitado por una longitud de onda de 510 a 560 nm emite fluorescencia roja, esto permite identificar células muertas o en proceso de degeneración; por otro lado, el Hoechst 33342 es capaz de atravesar membranas celulares intactas y se adhiere al ADN, generando una fluorescencia azul al ser excitado, identificando así a las células viables (Garner & Johnson, 1995; Muiño, 2008). Mientras que la funcionalidad de la membrana, se puede evaluar a través de la prueba de endosmosis (*Hypo-Osmotic Swelling Test*, HOST) que permite evaluar la funcionalidad de la membrana por medio de su capacidad para el transporte del agua al interior de la célula por ósmosis, por lo tanto, un espermatozoide con membrana íntegra y funcional expuesto a una solución hipoosmótica presenta evidencia por el abultamiento o enrollamiento de la cola (endosmosis) (Jeyendran et al., 1984).

Así como la integridad de la membrana espermática, la evaluación de la integridad acrosomal en el espermatozoide es esencial para garantizar una fecundación exitosa debido a que el acrosoma debe permanecer intacto hasta unirse con la zona pelúcida del oocito, donde desencadena la reacción acrosomal que permite la liberación y activación de diversas enzimas que en conjunto con la motilidad adquirida, penetrará la célula y dará paso a la fecundación (Honda et al., 2002).

La integridad acrosomal se puede evaluar por medio de diferentes tinciones; en llamas se aplicó la técnica de la triple tinción con Azul de Tripán, Rojo neutro y Giemsa, donde se pueden evaluar 4 patrones: 1 - espermatozoides vivos con acrosoma presente (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura); 2 - espermatozoides vivos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma lavanda claro u oscuro); 3 - espermatozoides muertos con acrosoma presente (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura); y 4 - espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro u oscuro) (Fumuso et al., 2015).

La tinción con el reactivo Coomassie Blue (CB) es una técnica sencilla que permite identificar presencia (teñido) o ausencia (no teñido) del capuchón acrosomal, pero no indica la viabilidad del mismo (Fumuso et al., 2014; Giuliano et al., 2012). En llamas se empleó una técnica dual que combina la prueba hipoosmótica (HOST) y la tinción con CB para evaluar la integridad de acrosoma y funcionalidad de membrana simultáneamente (Carretero et al., 2018) (Figura 3).

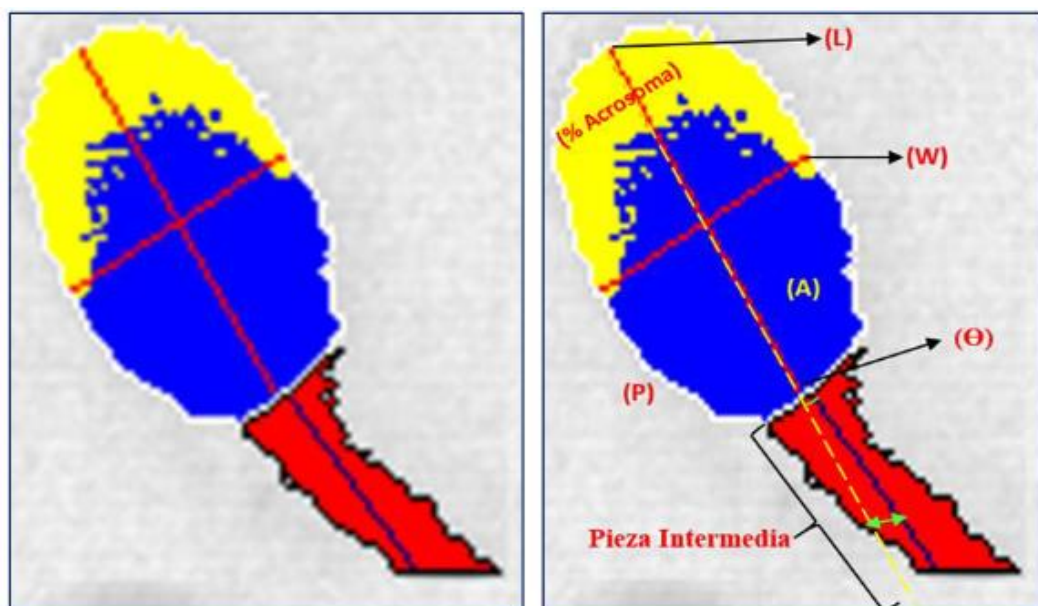


Figura 2. Morfometría de la cabeza del espermatozoide y el ángulo de inserción de la pieza intermedia; en amarillo, el capuchón acrosomal coloreado (Flores, 2018).

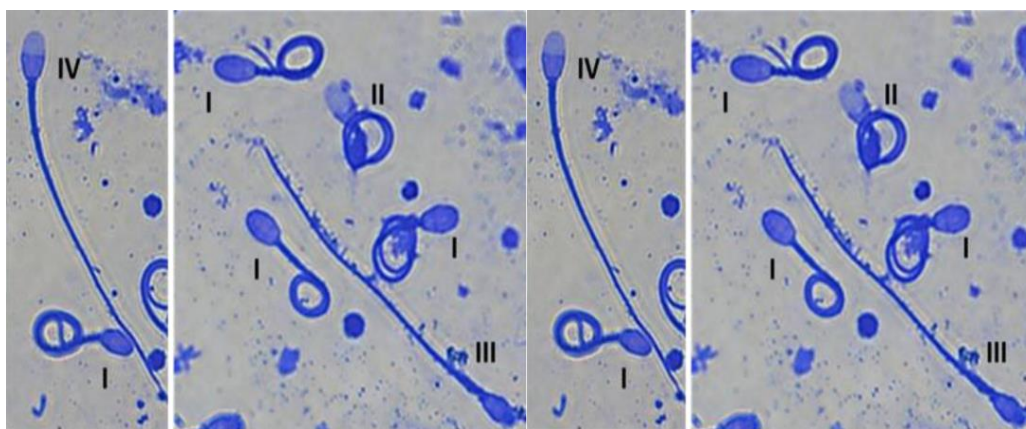


Figura 3. Espermatozoides de llama evaluados con la técnica de HOST en combinación con la tinción de CB. I) Espermatozoides con membranas funcionales y presencia de acrosoma, II) espermatozoide con membrana funcional y ausencia de acrosoma, III) espermatozoides sin funcionalidad de membranas y presencia de acrosoma y IV) espermatozoides sin funcionalidad de membranas y ausencia de acrosoma (Carretero et al., 2018).

Otras técnicas con microscopía de fluorescencia, como el uso de Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) con las lectinas Peanut Aglutinina, *Pisum sativum* Aglutinina y *Phaseolus vulgaris* Aglutinina (PNA, PSA, PHA) permiten evaluar la viabilidad del espermatozoide a través de la reacción acrosomal; el compuesto FITC-PNA posee la capacidad para unirse a los terminales de beta-galactosa localizados al interior de la membrana acrosómica externa y poder identificar el acrosoma en su estado íntegro, reaccionando o reaccionado (Carretero et al., 2015). En alpacas, se usó esta técnica fluorométrica con FITC-PNA (Figura 4); no obstante, esta técnica no diferencia espermatozoides vivos y muertos, a diferencia de FITC-PSA, se une a las glicoproteínas de la matriz acrosómica y complementado con el fluorocromo de Ioduro de Propidio (IP) permite identificar espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta, viables con membrana acrosomal dañada, muertos con membrana acrosomal intacta y espermatozoides muertos con membrana acrosomal dañada (Carretero et al., 2015); por consiguiente, al evaluar el semen de alpaca obtenido del epidídimo con el reactivo FITC-PSA, el 95 % de espermatozoides mostraron acrosoma íntegro (Delgado, 2019). Sin embargo, estas técnicas pueden requerir de equipamiento e insumos costosos.

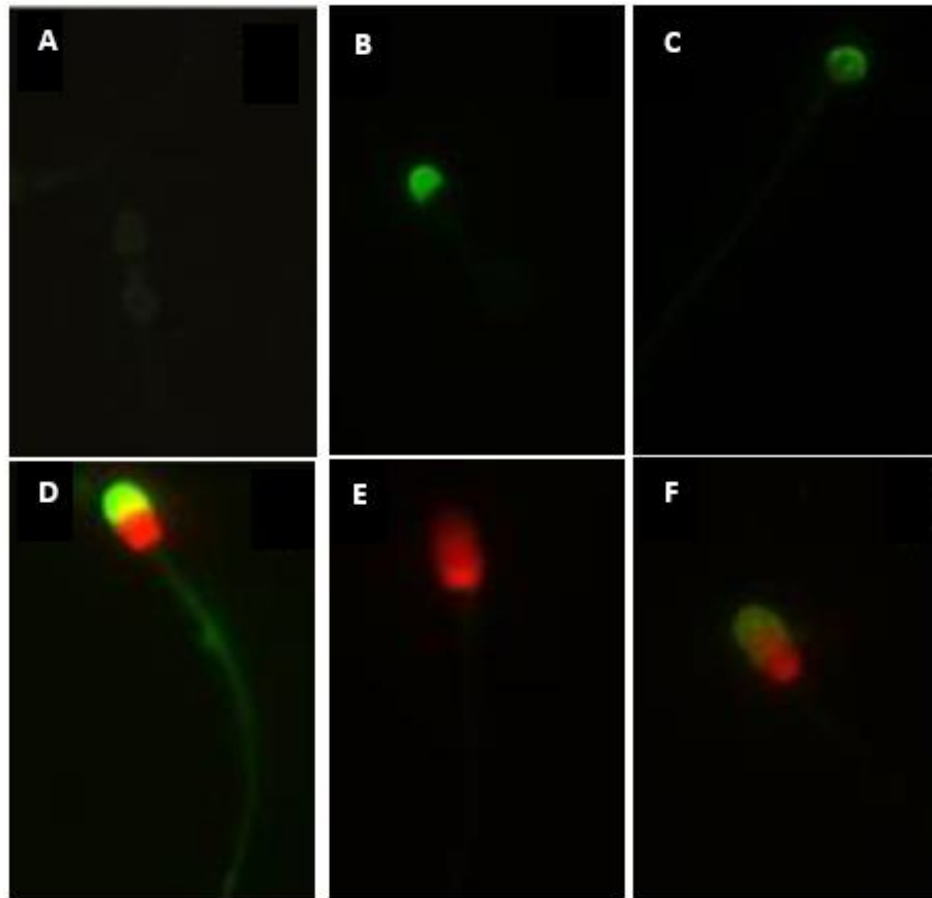


Figura 4. Espermatozoides de llama observados con la técnica de FITC-PNA/IP. A) Espermatozoide vivo con acrosoma intactos (sin fluorescencia en cabeza ni capuchón acrosomal), B) espermatozoide vivo con acrosoma reaccionando (sin fluorescencia en cabeza, fluorescencia verde intensa en capuchón acrosomal), C) espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado (sin fluorescencia en cabeza, fluorescencia verde en capuchón acrosomal en forma de puntillado o media luna), D) espermatozoide muerto con acrosoma reaccionando (fluorescencia roja en la cabeza, y fluorescencia verde intensa en capuchón acrosomal) y F) Espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado (fluorescencia roja en cabeza, fluorescencia verde en capuchón acrosomal) (Carretero et al., 2015).

2.4.3. Métodos de recolección de semen

A. Vagina artificial

La colecta de semen con vagina artificial, es un método que no requiere de equipos especializados, consta de un tubo de PVC de 25 a 30 cm de largo y 5 a cm de diámetro y forrado con un látex en el que se introduce agua con temperatura de 38 a 40 °C, toda la estructura es envuelta con una almohadilla térmica para mantener la temperatura (Bravo et al., 2000; Vaughan et al., 2003). No obstante, para realizar la colecta, previamente se requiere entrenar a los machos al uso de un maniquí considerando que la falta de libido puede generar el rechazo de algunos; por otro lado los movimientos anteroposteriores y de rotación del pene en la vagina artificial puede generar excesiva presencia de espuma y escaso volumen de semen que dificulten los exámenes seminales, así como también la duración de la eyaculación, dificultad para mantener la temperatura constante y la exposición del pene en el medio, pueden alterar la calidad del esperma colectado (Giuliano et al., 2008; Hanzen et al., 2015).

B. Electroeyaculación

Esta colección de semen se da a través de estímulos eléctricos de 0,2 V inducidos en intervalos de 1 a 3 segundos que va incrementando a 10 V en 6 a 12 min, para ello el animal se encuentra sedado y recostado de costado y la sonda del electroeyaculador es introducida por el recto y ubicada sobre la próstata (Hanzen et al., 2015). La duración de colecta con este método es menor, puede realizarse durante todo el año y no hay formación de espuma a diferencia del uso de la vagina artificial, sin embargo la muestra obtenida es más diluida, con baja concentración de espermatozoides por secreción de las glándulas anexas y puede ser contaminada por orina, así como también requiere de un profesional especializado, así como un equipo y protocolo adecuado (Giuliano et al., 2008).

C. Recuperación de espermatozoides del epidídimo

Consiste en la extirpación de las gónadas y separación de la cola del epidídimo e ir diseccionando el tejido conectivo para liberar los espermatozoides en una solución fisiológica buferada y realizar los análisis espermáticos, esta técnica permite establecer un protocolo de criopreservación del semen al no tener el plasma seminal que le proporciona la característica viscosa y se puede evaluar mejor la motilidad progresiva y la calidad del acrosoma en el espermatozoide, sin embargo no es posible conseguir muestras sucesivas de un mismo animal (Morton et al., 2008).

2.5. Plasma seminal de alpaca

2.5.1. Características del plasma seminal

El plasma seminal es un fluido secretado por las glándulas anexas en las alpacas y está compuesto por moléculas como azúcares, lípidos y proteínas que intervienen en la correcta función biológica de los espermatozoides desde la eyaculación hasta la fertilización. La interacción entre el plasma seminal y los espermatozoides induce la unión de las proteínas seminales a la superficie del espermatozoide vivos y los protege selectivamente para no ser fagocitados, de tal forma, juega un rol importante en el transporte, la supervivencia y la capacidad de fertilización de los espermatozoides en el tracto genital femenino (Druart & de Graaf, 2018; Muiño, 2008; Rodríguez et al., 2011). La variabilidad de calidad seminal entre distintos machos puede atribuirse a las diferencias en el plasma seminal (Muiño, 2008), dado que secreciones pre seminales tendrían efecto nocivo sobre la calidad espermática evidenciado en la disminución de la ,movilidad (Akçay et al., 2006).

2.5.2. Proteínas del plasma seminal

Las proteínas del plasma seminal de alpaca están representadas por 3 grupos principalmente, a) las proteínas con dominios de fibronectina tipo II (Fn2) correspondientes a masas moleculares de 220 y 215 kDa, estas se unen a los fosfolípidos de fosfatidilcolina o esfingomielina de la membrana del espermatozoide por un grupo de aminoácidos hidrofóbicos expuestos en la superficie (Greube et al., 2004; Rodríguez et al., 2011); b) las espermadhesinas o proteínas de unión a heparina que son de 12 a 16 kDa, sus actividades biológicas dependen de su secuencia, grado de glicosilación y su capacidad para unirse a la heparina; y c) las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP) que derivan de residuos de cisteína que residen en su porción C-terminal (Rodríguez et al., 2011)

A través de los años se ha determinado que el plasma seminal bovino (BSP: *bovine seminal plasma*) contiene una familia de proteínas que son producidas por las vesículas seminales y se han encontrado proteínas homólogas en otros mamíferos. En el toro, estas proteínas representan el 65% del total de proteínas en semen y en el caballo el 1% (Bergeron et al., 2005).

En los bovinos, inicialmente por medio de radioinmunoensayos específicos se identificaron tres proteínas representativas del plasma seminal bovino: BSP-A1/-A2, BSP-A3 y BSP-30 kDa, estas proteínas representaron del 40% al 57% de proteína total del plasma seminal (25% a 47% de BSP-A1/-A2, 3% a 5% de BSP-A3, y 3% a 7% de BSP-30 kDa) y 4% a 6% de proteína total de espermatozoide (2,5% a 4% de BSP-A1/-A2, 0,4% a 0,9% de BSP-A3 y 0,5% a 1% de BSP-30-kDa) (Nauc & Manjunath, 2000). Estas proteínas interactúan específicamente con fosfatidilcolina, recubren la superficie de los espermatozoides y participan en modificaciones de la membrana durante la capacitación (Desnoyers et al., 1994). Asimismo, las proteínas BSP1 y BSP5 se han relacionado también con la capacitación de los espermatozoides de toro, durante la cual actúan como un puente entre la heparina y la membrana del espermatozoide, fomentando la salida de colesterol. Además, el BSP1 ha demostrado además actividad como chaperona que dirige el plegamiento de proteínas en condiciones fisiológicas (Pini et al., 2016). Posteriormente, con métodos proteómicos de 2-D LC/MS/MS y SDS-PAGE se describió 99 proteínas en el plasma seminal del bovino (Kelly et al., 2006). En el toro Bali (*Bos javanicus*), se identificaron 116 puntos de proteínas de 10 a 250 kDa, siendo los predominantes los menores a

30 kDa, representadas por proteínas del grupo de espermadhesinas, aglutinante 313 de espermatozoides, BSP1 y Ribonucleasa seminal (Sarsaifi et al., 2015). Mientras que en el *Bos indicus*, con espectrometría de masas de alta resolución también se identificó 1 974 proteínas del plasma seminal que correspondieron a 277 583 coincidencias espectrales de péptidos (PSM) y 12 047 de las proteínas de los espermatozoides. En la caracterización, se identificaron 952 proteínas comunes en los espermatozoides y el plasma seminal, lo que representaba el 26% del total de proteínas (Ramesha et al., 2020).

En los carneros, por medio de un análisis de SDS-PAGE se identificaron aproximadamente 25 proteínas del plasma seminal con masas moleculares de 14 a 120 kDa, siendo la principal proteína una espermadhesina de 15,5 kDa que representaba el 45% del total de proteínas; otras proteínas principales eran homólogas a las proteínas del plasma seminal del bovino y fueron denominadas RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa y RSP-24 kDa, estas representaban el 20% del total de proteínas (Bergeron et al., 2005). (Bergeron et al., 2005). Posteriormente, en un análisis realizado con GeLC-MS/MS se identificaron 685 proteínas, entre las cuales resaltaron familias de proteínas de espermadhesinas, (espermadhesina Z13, bodhesina 2), ligadas a proteínas espermáticas (BSP 1, BSP 5) y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP2), se identificaron proteínas que habían sido reportadas anteriormente como proteína LEG1 en el proteoma de eyaculados del carnero pero no en muestras tomadas del epidídimo lo que sugiere que la proteína es secretada por una glándula sexual masculina accesoria (Pini et al., 2016). Asimismo, se reportó que las proteínas se encontraban de manera desproporcionada, ya que solo el 5% (39 de 727) constituía el 50% del espectro total, siendo las predominantes las proteínas de la familia de espermadhesinas y BSP, identificándose proteínas como espermadhesina-1 (SPADH1) y espermadhesina Z13 (SPADH2), BSP1 y BSP5, y bodhesina-2 (Soleilhavoup et al., 2014). Al utilizar SDS-PAGE y espectrometría de masas cuantitativa, se identificaron 362 proteínas, siendo la proteína BSP1 la que registró un espectro más alto, así también entre las principales estuvieron bodhesina 2, lactoferrina, clusterina y la proteína UPF0762; al realizar una comparación entre muestras de semen con alta y baja resistencia a congelación, se encontraron 75 y 48 proteínas más abundantes, respectivamente, de las cuales 8 estaban fuertemente correlacionadas con una resiliencia de congelación individual superior, y 6 estaban correlacionadas con una resiliencia de congelación

individual deficiente, estos resultados evidencian un vínculo en la composición proteica y la capacidad de congelación del plasma seminal (Rickard et al., 2015).

En el plasma seminal de camélidos se resalta una proteína en específica llamada Factor de Inducción para la Ovulación (□-NGF) que provoca la ovulación en las hembras al momento de la cópula, ha sido identificado como una proteína de 13-14 kDa muy abundante en el plasma seminal de alpaca y llama (Kershaw-Young, Druart, et al., 2012; Ratto et al., 2010), constituyendo 47% y 25% de la cantidad total de proteínas en el plasma seminal de alpaca y camello respectivamente (Druart et al., 2013). En camellos, la técnica 2D-PAGE, identificó 100 puntos proteicos desde 15 kDa a 100 kDa, de entre las cuales se identificaron 19 proteínas por MALDI TOF, debido a la limitada información disponible sobre el genoma de los camélidos (Druart et al., 2013; Kumar et al., 2013).

2.5.3. Influencia de la estacionalidad en las proteínas del plasma seminal

El plasma seminal puede sufrir variaciones en su composición debido a factores externos como la estacionalidad. El cambio de temperatura puede generar cambios en la fisiología del animal, así como se muestra en una evaluación proteómica por medio de nano cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada con espectrometría de masas, que reportó que la proteína Caltrin tiene una relación significativa negativa con la temperatura del aire y con el malestar térmico en el animal, mientras la proteína Ribonucleasa 4 se correlacionó positivamente. Así también, 12 proteínas en verano y 8 en invierno mostraron correlaciones significativas con la cinética de los espermatozoides, mientras las proteínas albúmina sérica, catepsina L1 y sulfhidrilo oxidasa (QSOX1) presentaron correlaciones con los defectos espermáticos, 10 proteínas se correlacionaron con la viabilidad de la membrana espermática en verano, mientras con una sola proteína (Gelsolin) en invierno (Souto et al., 2021).

En el toro *Bos taurus indicus* se reportó que en verano las proteínas de 9 kDa y 12 kDa mostraron porcentajes más bajos (72,72% y 45,45%, respectivamente), mientras que en invierno estas mismas proteínas presentaron porcentajes más altos (90,90% y 63,63%, respectivamente), estos resultados están relacionados con la calidad del esperma que fue mejor en la época de invierno; otras proteínas como la de 20 kDa mostraron la misma incidencia (27,27%) en ambas temporadas (Chacur et al., 2011).

En el toro criollo también se encontró diferencia proteómica del plasma seminal en distintas épocas, siendo las proteínas de 5,4; 6,5; 14,2; 19,9; 24,0 y 45,0 kDa las que se presentaron en mayor concentración en época de lluvia, y las proteínas de 29,0; 33,3; 35,1; 61,1; 66,0; 72,8 y 89,7 kDa en época de secano. Además 3 proteínas de 17,1; 20,1; 36,0 kDa no se expresaron en la época lluviosa. Así también, las proteínas que se presentaron en el total de animales experimentales en la época lluviosa y disminuyeron su frecuencia de presentación en la época seca fueron las de peso molecular 89,7 y 6,5 kDa. Por otro lado, se sugiere también una correlación directa entre la concentración de espermatozoides y algunas proteínas de 29 kDa, 36 kDa y 33.2 kDa, asociándose esta última de forma inversa con la motilidad espermática y viabilidad espermática (Barajas, 2013).

Sin embargo, otro trabajo realizado en bovinos durante las temporadas de invierno, verano y lluvia, no mostraron diferencia significativa en la calidad del semen y por consecuencia en el proteoma del plasma seminal, solo se detectó pequeñas diferencias en las proteínas fijadoras de fosforilcolina según la estación, siendo menores en verano que en invierno o en época de lluvias de acuerdo a un análisis rápido de cromatografía líquida para proteínas (FPLC) (Lima Verde et al., 2020).

En camélidos, un estudio en llamas reporta que durante el verano se obtiene mejores características seminales en cuanto a la motilidad espermática, volumen y concentración en comparación a la temporada de primavera (Ferré et al., 2015), y en alpacas, un trabajo realizado durante la estación de verano e invierno en la costa peruana se reportó que en la época de invierno se tiene mejores características seminales en cuanto a concentración, movilidad, vitalidad y frecuencia de espermatozoides normales, debido a un efecto negativo por estrés al calor (Villanueva et al., 2018), mientras que otro trabajo realizado en Puno, indica que la época del año no influye en dichas variables en el semen de alpacas (Huanca et al., 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

La colecta y análisis de calidad seminal se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto de Innovación Agraria – INIA CANAAN, Ayacucho, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, provincia de Huamanga, región Ayacucho a una altitud de 2736 msnm y latitud 13°09'48" S y una longitud oeste de 74°12'20" W; y los análisis moleculares en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Los datos meteorológicos fueron obtenidos de la Red Hidrometeorológica – OPEMAN en la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto de Innovación Agraria – INIA CANAAN, Ayacucho.

Época de secano (agosto y septiembre):

- Precipitación: $0,29 \pm 0,36$ mm
- Temperatura Máxima: $26,25 \pm 0,39$ °C
- Temperatura Mínima: $9,24 \pm 1,59$ °C
- Humedad relativa: $76,73 \pm 0,67$ %

Época de lluvia (noviembre y diciembre):

- Precipitación: $2,21 \pm 1,11$ mm
- Temperatura Máxima: $25,95 \pm 0,58$ °C
- Temperatura Mínima: $11,79 \pm 0,22$ °C
- Humedad relativa: $82,09 \pm 3,15$ %
-

3.2. Población y muestra

La población de estudio fue del plantel de reproductores de la Estación Experimental Agraria Canaán del INIA, Ayacucho. La muestra estuvo constituida por 48 eyaculados colectados por vagina artificial de 8 alpacas macho en edad reproductiva de entre 4 a 8 años de edad de raza Huacaya, considerándose 3 eyaculados por individuo en cada época de estudio (secano y lluvia).

3.3. Metodología

3.3.1. Obtención de muestra seminal

Previo a la colección de semen, se realizó la selección y el entrenamiento de machos para la aceptación al maniquí de colecta y vagina artificial.

Las colectas se realizaron semanalmente (2 veces por semana), hasta completar las 3 colectas requeridas por cada macho en cada época; las muestras contaminadas, con bajo volumen, baja motilidad o concentración fueron descartadas.

Para la colecta de semen se usó la técnica de vagina artificial (Bravo et al., 2000; Sumar, 1983; Vaughan et al., 2003) adaptado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto de Innovación Agraria – INIA CANAAN, Ayacucho. Se utilizó un tubo PVC con una funda de látex en el interior ajustado a los extremos, y a un extremo incorporado una bolsa de polietileno en forma cónica fijada a un tubo de centrífuga cónico de 15 mL para la recepción de la muestra (Figura 5). Se agregó agua a 45 °C al interior del tubo (entre el látex y el tubo) para mantener la vagina artificial a una temperatura constante de 37 °C y se introdujo aire para mantener la presión de las paredes internas, la vagina artificial fue envuelta con una bolsa de agua caliente y frazadillas para mantener la temperatura constante de 36 a 37 °C durante el tiempo de cópula.

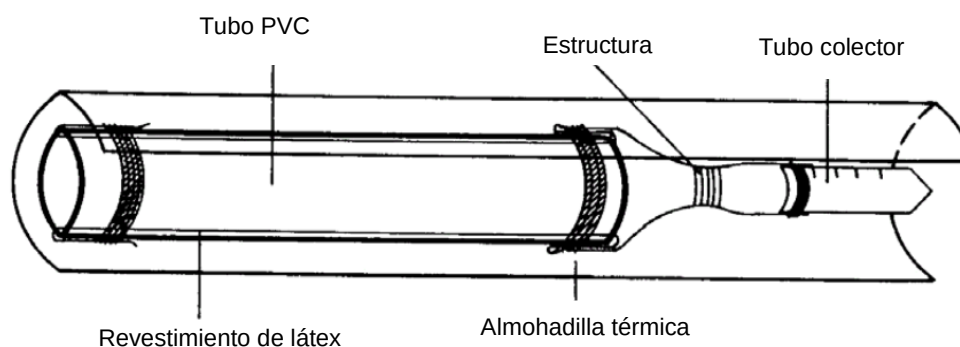


Figura 5. Diagrama de la vagina artificial usada para colectar semen de alpaca (Vaughan et al., 2003).

Se desinfectó la zona del periné del maniquí con alcohol al 70 % y se aseguró la vagina artificial por debajo y dentro del maniquí, y se colocó en posición de monta. En cada colecta se monitoreó constantemente al macho y de ser necesario se ayudó durante la penetración, se registró el tiempo de monta y observaciones específicas del comportamiento de cada macho. Al terminar la colecta, se trasladó la vagina artificial al laboratorio, se retiró el tubo colector con la muestra y se puso inmediatamente en Baño María a 37 °C para realizar los análisis seminales.

3.3.2. Análisis macroscópico

Los análisis macroscópicos seminales se realizaron inmediatamente después de la colecta por observación directa de la muestra con los protocolos adaptados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán- INIA CANAAN, Ayacucho.

A. Volumen

El volumen (mL) se determinó con la escala graduada del tubo colector de 15 mL.

B. Espuma

La cantidad de espuma generada en la muestra durante el tiempo de cópula, se midió con una regla (cm) en el tubo colector con escala graduada de 15mL (Contreras et al., 2024).

C. Color

Se determinó por observación y clasificado como en tonalidades de blanco que presentaba la muestra: blanco lechoso, blanco cristalino y cristalino (Contreras et al., 2024).

D. Filancia

Se evaluó a través de la filancia generada por la muestra, para ello se tomó 10 μ L de semen y se colocó sobre un portaobjetos elevando la punta del tip generando un hilo hasta su punto máximo, la longitud del hilo formado se evaluó con una regla milimetrada (Figura 6).

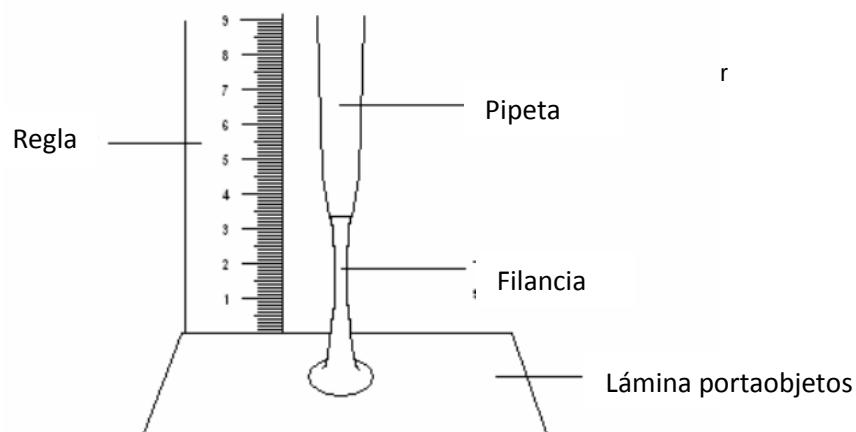


Figura 6. Medición de la filancia del semen de alpaca (Morton et al., 2008).

3.3.3. Análisis microscópico

Los análisis microscópicos seminales se realizaron con los protocolos adaptados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria CANAAN- INIA, Ayacucho.

A. Concentración

Se usaron 10 μ L de semen y se colocaron en IMV® Lámina Portaobjetos Leja de 20 μ m atemperada a 37 °C, se evaluó a través del microscópico con un aumento de 200X (Carl Zeiss Axiolab) acoplado a un servidor con el Sistema de Análisis Seminal Computarizado (CASA) (AndroVision®; Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), en el que se determinó la concentración espermática expresado en millones por mililitro (Mill/mL), en cada análisis se evaluó 3 campos diferentes homogéneos y se reportó el promedio.

B. Movilidad

La movilidad espermática se determinó por estimación visual previo entrenamiento. Para ello se tomaron 10 μ L de semen y se colocaron en IMV® Lámina Portaobjetos Leja de 20 μ m atemperada a 37 °C y se observó a 200X al microscopio (Carl Zeiss Axiolab), se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles en relación al total de espermatozoides del campo observado. En cada análisis se evaluó 3 campos diferentes homogéneos y se reportó el promedio.

C. Integridad de membrana

Para evaluar la viabilidad a través del análisis de integridad de membrana, se usaron 10 μ L de semen y se colocaron en un tubo de microcentrífuga ámbar de 0,5 mL previamente atemperado a 37 °C. Inmediatamente se agregó 5 μ L del reactivo Hoechst 33342 y 5 μ L de Ioduro de Propidio, se puso a incubar a 37 °C por 15 min. Al finalizar, se evaluaron 10 μ L de muestra en una lámina portaobjetos y cubreobjetos sobre la placa térmica del microscopio con filtro de fluorescencia. El análisis se realizó al microscopio a un aumento de 400X (Carl Zeiss Axiolab) y en un cuarto oscuro, se contó un total de 200 espermatozoides y se obtuvo el porcentaje de espermatozoides teñidos de azul (viables con membrana íntegra) y los espermatozoides rojos-violeta (no viables o en proceso de degeneración) (Muiño, 2008; Orellana, 2024) (Figura 7).

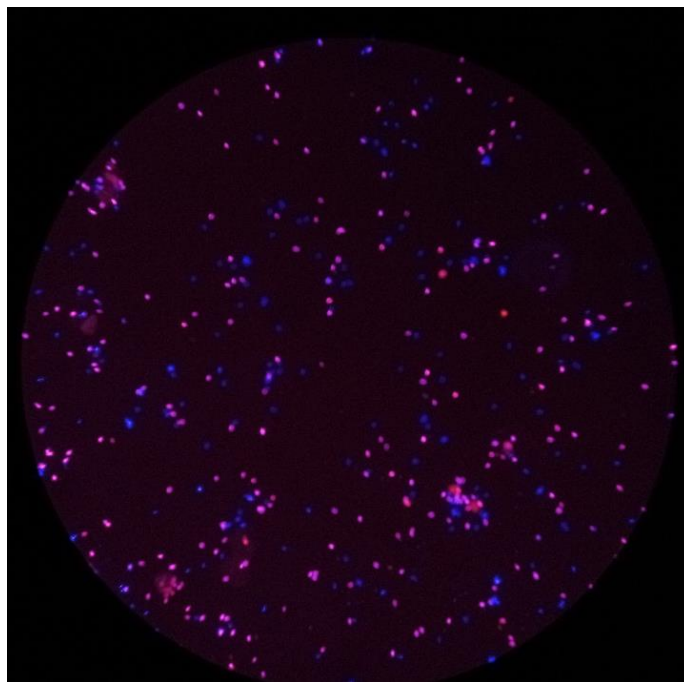


Figura 7. Espermatozoides emitiendo fluorescencia con Hoechst 33342 y Ioduro de Propidio vistos al microscopio al aumento de 400X. En azul espermatozoides vivos y en rojo, muertos. INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

D. Funcionalidad de membrana e integridad de acrosoma

La funcionalidad de membrana e integridad de acrosoma se evaluaron en un análisis dual de acuerdo a lo descrito por Carretero et al. (2018). Para ello se colocó 50 μL de muestra de semen en 200 μL de medio hipoosmótico a 50 mOsm/Kg (Fructuosa 0,1125 g y Citrato de sodio 0,06125 g) y se incubó a 37°C por 20 min. Luego, se agregó 200 μL de paraformaldehído diluido al 4% en PBS al 1X, se homogenizó y dejó a temperatura ambiente por 5 min. Al finalizar, se centrifugó a 800 x g (gravidades) por 10 min y se descartó el sobrenadante sin eliminar el sedimento de espermatozoides formado en el inferior del tubo. Se resuspendió el sedimento en 50 μL de PBS al 1X, se realizó un frotis con 30 μL de muestra y se dejó secar completamente. Posteriormente, se cubrió la lámina con el colorante Azul de Coomassie al 0,22% (0,22% Azul de Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético glacial) y se dejó reposar por 20 min para colorear las células. Al terminar, se eliminó el residuo de colorante con agua destilada, dejó secar la lámina y se evaluó al microscopio a un aumento de 1000X.

Para el análisis de funcionalidad de membrana se contaron 200 espermatozoides y la clasificación se hizo de acuerdo a (Jeyendran et al., 1984), se consideraron espermatozoides con membrana funcional a los que reaccionaron al estrés hipoosmótico mediante la hinchazón de la cola (Figura 8) mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola (Figura 8a) fueron considerados funcionalmente dañados. Los datos se expresaron en porcentajes.

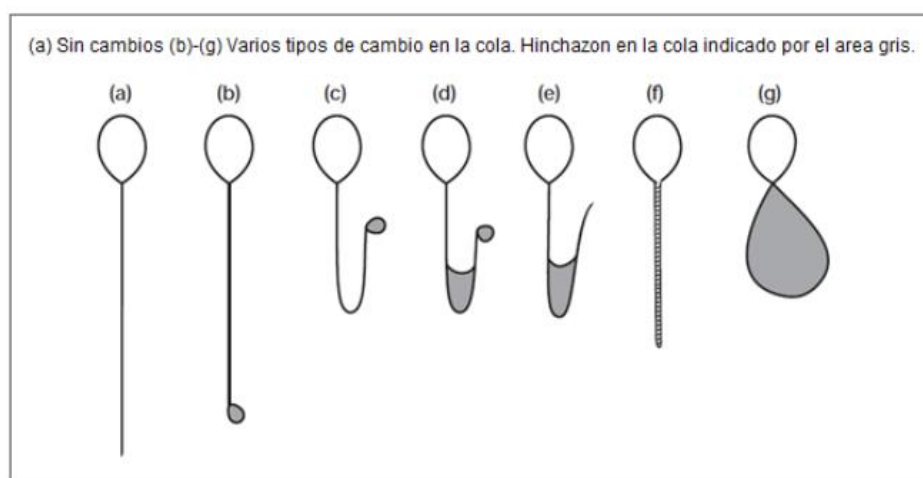


Figura 8. Representación gráfica de cambios morfológicos en espermatozoides sometidos al test hipoosmótico (Jeyendran et al., 1984).

Para el análisis de integridad de acrosomal, se contaron 200 espermatozoides y la clasificación se realizó de acuerdo a (Giuliano et al., 2012), las células con acrosoma presente mostraron una coloración azul uniforme en la región del capuchón acrosomal (teñido), mientras que los espermatozoides con acrosoma ausente mostraron un área limpia (no teñido). Los datos se expresaron en porcentajes (Figura 9).

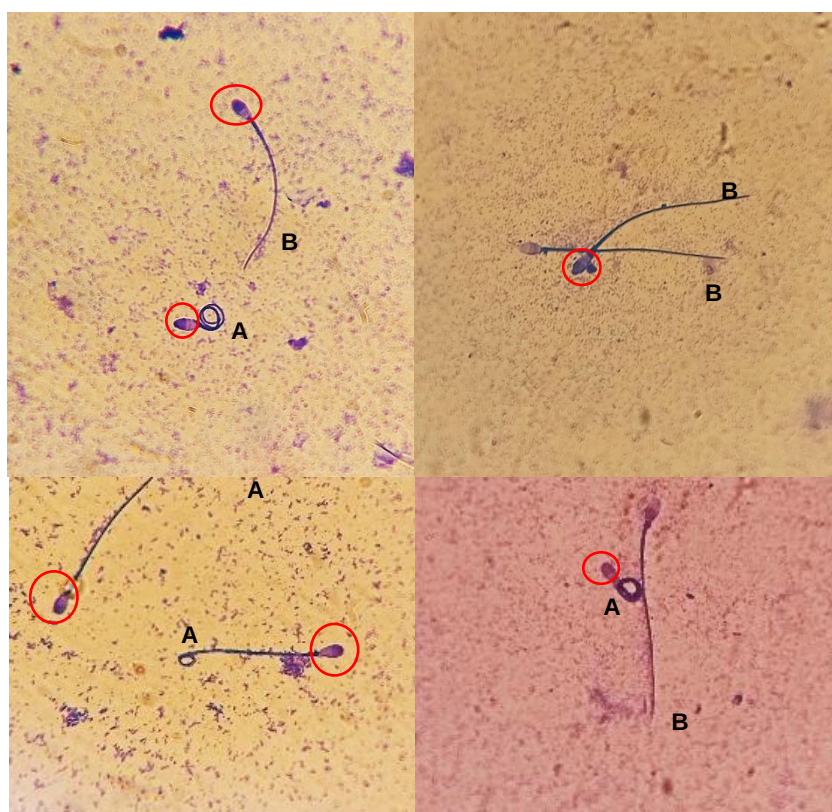


Figura 9. Espermatozoides sometidos a la prueba dual de HOST y coloración con Azul de Coomassie evaluados al microscopio al amento 100X. A) Espermatozoides con cola enrollada: membrana funcional B) Espermatozoides con la cola recta: membrana no funcional. Espermatozoides marcados en rojo con capuchón acrosomal coloreado: acrosoma presente. INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

3.3.4. Obtención del plasma seminal

Las muestras de semen fresco fueron transportadas con gel packs fríos (para evitar el daño de las proteínas) al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se realizaron los análisis de proteínas.

Las muestras de semen se centrifugaron a $10\,000 \times g$ (gravidades) por 20 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante transparente a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL nuevo (se repitió este proceso dos veces). Se colocó 10 μL del plasma seminal recuperado en una lámina portaobjetos para evaluar al microscopio a 400X y verificar la ausencia de espermatozoides. Para las muestras que presentaron mucha viscosidad, se usó una jeringa de 5 mL con una aguja de $0,45 \times 12$ mm para aspirar y expulsar el semen por al menos 10 veces con la finalidad de disminuir la filancia. Las muestras de plasma seminal fueron distribuidas en alícuotas de 100 μL con PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo) al 1mM de concentración final, el cual es un inhibidor de proteasas que evita la degradación de las proteínas. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.3.5. Cuantificación de proteínas

A. Curva de calibración con albúmina

Se preparó un stock inicial de con la proteína albúmina sérica bovina (BSA Sigma-Aldrich) al $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ con agua desionizada, a partir de ello se prepararon soluciones estándar de 0; 2; 4; 8; 10; 12; 16 y $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ (por triplicado).

Se usó el reactivo comercial Bradford (Bio-Rad, USA), el cual se diluyó en 1:2,5 (1 mL de Bradford + 1,5 mL de agua desionizada) antes de realizar el análisis de proteínas.

Se mezclaron 100 μL de la solución estándar de albumina y 100 μL del reactivo de Bradford diluido, se homogenizó y dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente. Al terminar, se observó la escala de intensidad del azul de acuerdo a la concentración de proteína, el estándar con $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA reportó un color azulino más intenso que los de menor concentración (Figura 10). Se cuantificó la

absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro BioPhotometer *plus* Eppendorf y se realizó la curva de calibración en Microsoft Excel para determinar la ecuación lineal de la recta de tendencia (Figura 11).

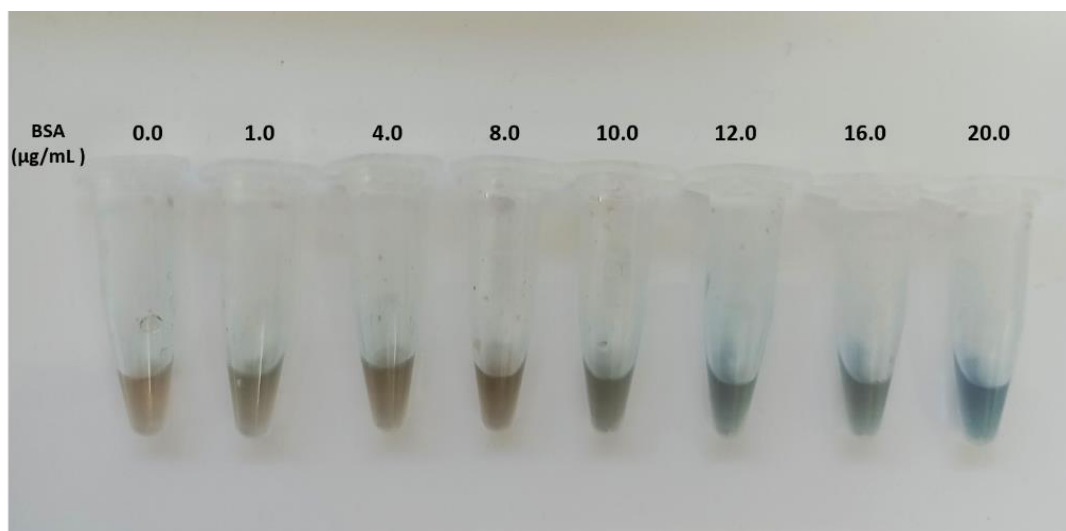


Figura 10. Escala de colorimetría visual de la curva de calibración de estándares de BSA (µg/µL) con Bradford al 1:2,5. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

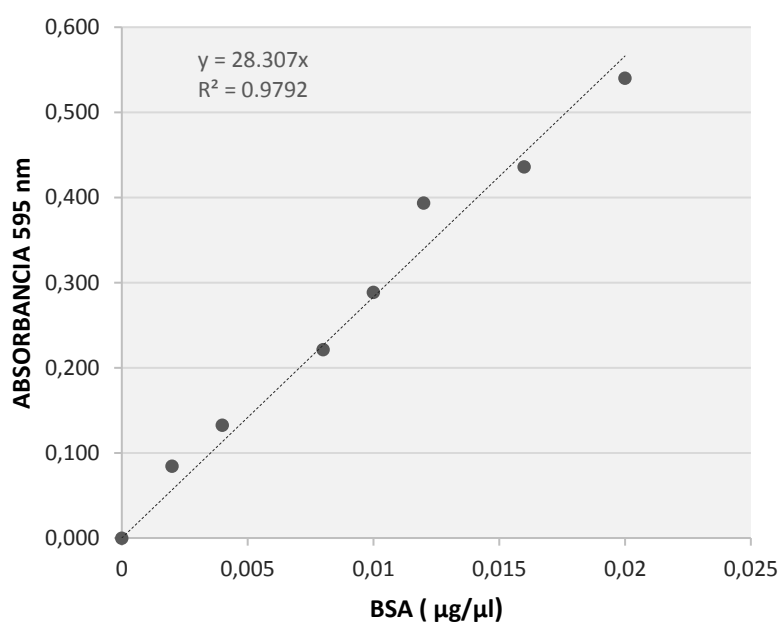


Figura 11. Línea de tendencia y ecuación de la curva de calibración de estándares de BSA (0; 2; 4; 8; 10; 12; 16 y 20 µg/µL) con Bradford al 1:2,5. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

B. Cuantificación de muestras seminales

Las muestras de plasma seminal contenían un alto porcentaje de proteínas y las lecturas al espectrofotómetro estuvieron fuera del rango calculable, es por ello que se diluyó con agua desionizada 1:800 (1 μL de muestra y 999 μL de agua) y se homogenizó. De la dilución se transfirió 100 μL a un microtubo nuevo estéril y se mezcló con 100 μL de la solución Bradford 1:2.5, se homogenizó y se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente. Al terminar, se colocaron las muestras en un *cooler* con hielo para estabilizar la reacción y se leyó la absorbancia a 595 nm en el BioPhotometer *plus* Eppendorf, finalmente se determinó la concentración de proteína total con ecuación lineal de la curva de calibración con BSA, se evaluó cada muestra por triplicado y se reportó el promedio.

3.3.6. Electroforesis SDS-PAGE unidimensional

Se realizó procesos de electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (1D - SDS PAGE) para la separación y cuantificación de las proteínas del plasma seminal en función de su peso molecular, para ello se usó el equipo Mini-PROTEAN Tetra System – BioRad. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, según protocolo de Laemmli (1970) con algunas variaciones.

A. Elaboración de geles

Los geles se elaboraron en dimensiones de 8,6 cm x 6,8 cm y de 1,0 mm de grosor. Se preparó 5 mL de gel separador que estuvo constituido por acrilamida/bisacrilamida al 15%, el cual se diluyó a partir de una solución de 35% (17,5 g de acrilamida y 0,47 g de bisacrilamida) en Buffer Tris-HCl 1.5M pH 8,8 y SDS al 0,1%, APS al 0,05% y 1,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de TEMED para la polimerización. Inmediatamente después de agregar todos los componentes, se homogenizó sutilmente y con una micropipeta de 1000 μL se agregó al molde compuesto de 2 vidrios paralelos y ajustado a los extremos, luego de agregar toda la solución se cubrió con agua destilada y se dejó polimerizar por 30 min.

Se preparó 2 mL de gel concentrador, estuvo compuesto por acrilamida/bisacrilamida al 4%, el cual se diluyó a partir de una solución de 40% (20 g de acrilamida y 0,53 g de bisacrilamida) en Buffer Tris-HCl 0,5M pH 6,8 y SDS al 0,1%, APS al 0,1% y 2 µL/mL de TEMED, y se homogenizó la mezcla. Se descartó el agua destilada del molde e inmediatamente se agregó la solución del gel concentrador, se colocaron los peines del molde para formar los pocillos y se dejó polimerizar por 30 min.

Al finalizar la polimerización de los geles, se trasladó los vidrios a la cámara de electroforesis y se colocó el buffer de corrida compuesto por Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 1%, ajustado a pH 8,3. Se realizó una pre-corrida sin muestras a 150 V por 60 min.

B. Preparación de muestra y electroforesis

Se diluyó 40 µL con 80 µL de buffer de carga, el cual estaba constituido por el buffer Tris-HCl 0.5M pH 6,8 para regular el pH en la solución, glicerol 11,11% que aumenta la densidad de la muestra, SDS 2,2% que desnaturaliza y despliega las proteínas cargándolas negativamente, azul de bromofenol 0,06% para visualizar el movimiento de la muestra a través del gel y β-mercaptoetanol al 11,1% que rompe los puentes disulfuro y se pierda la estructura cuaternaria de las proteínas (Molloy, 2000). Se incubaron las muestras a 98 °C por 15 min en un termociclador para favorecer la desnaturalización de proteínas. Finalmente, se conservaron las muestras a 4 °C hasta su uso.

Se colocaron 60 g de proteína en cada pocillo del gel (se cargó distintos volúmenes de acuerdo a la cantidad de proteína en cada muestra) (Figura 22), a los extremos laterales se colocó los marcadores de peso molecular de amplio rango *Three-color Prestained Protein Marker WSHT* (245 kDa a 11 kDa) y de menor rango *Prestained Low Range Protein Marker WSHT* (66,2 kDa a 6,2 kDa), posteriormente se realizó la corrida el buffer de corrida, previamente descrito, a 80 V por 2 h , hasta visualizar el azul de bromofenol en el extremo inferior del gel. Al finalizar, se extrajo con mucho cuidado solo los geles para ser coloreados (Figura 12).



Figura 12. Electroforesis 1D – SDS PAGE con el equipo Mini-PROTEAN Tetra System – BioRad. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

C. Tinción de geles, fotodocumentación y análisis de imágenes

Los geles fueron sumergidos en un medio con azul de coomassie al 0,05% y sulfato de cobre al 0,1% diluido en metanol al 30% y ácido acético glacial al 10%, por 2 h y 30 min con movimiento constante. Posteriormente, se trasladó el gel a un medio decolorante con metanol al 30% y ácido acético glacial al 10% por 16 h con movimiento constante.

Finalmente los geles se fotodocumentaron con el equipo GelDoc Go (Bio-Rad USA). El peso molecular y la concentración relativa de cada banda se determinaron de acuerdo a los picos de intensidad reportados con el programa Image Lab 6,1.

3.3.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA y prueba de Turkey para evaluar la variabilidad de calidad seminal entre individuos. Para realizar la comparación de calidad seminal y concentración relativa de proteínas en la época de secano y lluvia, se realizó una prueba de T-Student de muestras emparejadas. Se determinó la Correlación de Pearson (r) entre la concentración relativa de cada banda de proteína y los parámetros de calidad seminal. Todos los análisis se realizaron en Microsoft Excel y SPSS 29.0.1.0.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis de calidad seminal

4.1.1. Calidad seminal en época de secano

Tabla 1. Media $\pm$ DS del análisis macroscópico y microscópicos de semen fresco de alpaca en época de secano (n =8, r=3). INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

N° alpaca	Volumen (mL)	Concentración (Mill/mL)	Filancia (cm)	Movilidad (%)	Viabilidad espermática		
					Integridad de membrana (%)	Funcionalidad de membrana (%)	Integridad acrosomal (%)
1	1,50 $\pm$ 0,32	179,00 $\pm$ 68,74 ^a	2,83 $\pm$ 0,29 ^a	85,00 $\pm$ 8,66 ^a	54,90 $\pm$ 3,16	49,32 $\pm$ 4,71 ^d	92,74 $\pm$ 3,86
2	1,20 $\pm$ 0,26	162,67 $\pm$ 24,66 ^a	0,40 $\pm$ 0,17 ^b	67,57 $\pm$ 9,96 ^{ab}	52,91 $\pm$ 1,96	49,29 $\pm$ 5,20 ^d	91,09 $\pm$ 2,41
3	1,40 $\pm$ 0,17	175,33 $\pm$ 11,50 ^a	0,33 $\pm$ 0,15 ^b	53,63 $\pm$ 3,25 ^b	48,51 $\pm$ 4,31	79,44 $\pm$ 9,30 ^{ab}	93,46 $\pm$ 4,38
4	1,57 $\pm$ 0,75	110,67 $\pm$ 26,08 ^{ab}	0,43 $\pm$ 0,12 ^b	83,63 $\pm$ 8,27 ^a	54,48 $\pm$ 2,68	94,09 $\pm$ 3,48 ^a	93,38 $\pm$ 3,08
5	1,17 $\pm$ 0,29	105,33 $\pm$ 23,44 ^{ab}	0,33 $\pm$ 0,29 ^b	67,90 $\pm$ 11,39 ^{ab}	52,63 $\pm$ 6,25	50,92 $\pm$ 5,94 ^d	94,09 $\pm$ 1,97
6	1,07 $\pm$ 0,12	165,67 $\pm$ 41,36 ^a	0,57 $\pm$ 0,12 ^b	59,50 $\pm$ 1,93 ^b	51,71 $\pm$ 4,53	53,05 $\pm$ 6,09 ^{cd}	94,83 $\pm$ 0,29
7	3,00 $\pm$ 1,18	64,00 $\pm$ 13,53 ^b	2,83 $\pm$ 1,44 ^a	53,30 $\pm$ 6,06 ^b	50,14 $\pm$ 6,59	70,99 $\pm$ 8,60 ^{bc}	91,65 $\pm$ 2,25
8	2,10 $\pm$ 1,23	54,67 $\pm$ 8,96 ^b	1,67 $\pm$ 0,58 ^{ab}	55,07 $\pm$ 3,07 ^b	59,99 $\pm$ 5,11	67,08 $\pm$ 9,17 ^{bcd}	92,27 $\pm$ 5,94
MEDIA $\pm$ DS	1,63 $\pm$ 0,92	125,92 $\pm$ 55,30	1,18 $\pm$ 1,17	65,7 $\pm$ 13,71	53,16 $\pm$ 5,07	64,27 $\pm$ 16,85	92,94 $\pm$ 3,09

Los subíndices muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) en cada columna.

4.1.2. Calidad seminal en época de lluvias

Tabla 2. Media $\pm$ DS del análisis macroscópico y microscópicos de semen fresco de alpaca en época de lluvias (n =8, r=3). INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

N° alpaca	Volumen (mL)	Concentración (Mill/mL)	Filancia (cm)	Movilidad (%)	Viabilidad espermática		
					Integridad de membrana (%)	Funcionalidad de membrana (%)	Integridad acrosomal (%)
1	1,93 $\pm$ 0,12	164,33 $\pm$ 15,04 ^a	1,67 $\pm$ 0,58 ^a	60,73 $\pm$ 3,04 ^b	53,37 $\pm$ 2,36	40,57 $\pm$ 5,91 ^e	95,30 $\pm$ 1,52 ^{ab}
2	1,43 $\pm$ 0,40	167,33 $\pm$ 7,51 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^b	91,00 $\pm$ 9,54 ^a	48,97 $\pm$ 7,46	74,26 $\pm$ 7,77 ^{bc}	97,67 $\pm$ 2,83 ^{ab}
3	0,37 $\pm$ 0,21	149,00 $\pm$ 41,22 ^a	0,17 $\pm$ 0,29 ^b	91,87 $\pm$ 9,41 ^a	53,81 $\pm$ 4,45	82,55 $\pm$ 8,76 ^{ab}	95,20 $\pm$ 3,11 ^{ab}
4	0,97 $\pm$ 0,46	162,67 $\pm$ 48,19 ^a	0,07 $\pm$ 0,12 ^b	63,97 $\pm$ 16,44 ^{ab}	53,19 $\pm$ 1,50	93,71 $\pm$ 2,82 ^a	98,40 $\pm$ 1,98 ^a
5	0,93 $\pm$ 0,31	93,33 $\pm$ 21,55 ^{ab}	0,17 $\pm$ 0,29 ^b	53,90 $\pm$ 3,58 ^b	46,65 $\pm$ 8,13	60,29 $\pm$ 3,09 ^{cd}	93,56 $\pm$ 3,48 ^{ab}
6	1,37 $\pm$ 0,51	140,00 $\pm$ 33,15 ^{ab}	0,07 $\pm$ 0,12 ^b	59,33 $\pm$ 3,67 ^b	52,56 $\pm$ 3,20	34,69 $\pm$ 2,09 ^e	94,60 $\pm$ 2,58 ^{ab}
7	1,83 $\pm$ 0,65	54,33 $\pm$ 7,23 ^b	2,67 $\pm$ 0,58 ^a	71,37 $\pm$ 6,82 ^{ab}	55,44 $\pm$ 7,32	50,83 $\pm$ 5,00 ^{de}	88,50 $\pm$ 0,60 ^b
8	2,03 $\pm$ 1,76	106,00 $\pm$ 42,14 ^{ab}	2,50 $\pm$ 0,87 ^a	61,43 $\pm$ 15,89 ^b	48,02 $\pm$ 6,54	41,99 $\pm$ 8,22 ^e	92,29 $\pm$ 7,02 ^{ab}
MEDIA $\pm$ DS	1,36 $\pm$ 0,82	129,63 $\pm$ 46,92	0,91 $\pm$ 1,18	69,20 $\pm$ 6,18	51,37 $\pm$ 5,65	59,86 $\pm$ 21,26	92,94 $\pm$ 4,11

Los subíndices muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) en cada columna.

4.1.3. Comparación de calidad seminal en época de secano y lluvias

Tabla 3. Media $\pm$ DS de la comparación de los parámetros de calidad de semen fresco de alpaca en época de secano y lluvias (n=8; r=3). INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

Parámetros de calidad	Secano	Lluvia	MEDIA $\pm$ DS
Volumen (mL)	1,63 $\pm$ 0,92	1,36 $\pm$ 0,82	1,49 $\pm$ 0,60
Concentración (Mill/mL)	125,92 $\pm$ 55,30	129,63 $\pm$ 46,92	127,78 $\pm$ 44,36
Filancia (cm)	1,18 $\pm$ 1,17	0,91 $\pm$ 1,18	1,04 $\pm$ 1,11
Movilidad (%)	65,7 $\pm$ 13,71	69,20 $\pm$ 16,18	67,45 $\pm$ 13,38
Integridad de membrana (%)	53,16 $\pm$ 5,07	51,50 $\pm$ 5,65	52,33 $\pm$ 3,32
Funcionalidad de membrana (%)	64,27 $\pm$ 16,85	59,86 $\pm$ 21,26	62,07 $\pm$ 18,76
Integridad de acrosoma (%)	92,94 $\pm$ 3,09	94,44 $\pm$ 4,11	93,69 $\pm$ 2,42

No existe diferencia significativa ($p>0,05$)

Tabla 4. Media $\pm$ DS de la comparación de los parámetros de calidad de semen fresco de cada individuo en época de secano y lluvias (n=8, r=3). INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

Época	N° alpaca	Volumen (mL)	Concentración (Mill/mL)	Filancia (cm)	Movilidad (%)	Viabilidad espermática		
						Integridad de membrana (%)	Funcionalidad de membrana (%)	Integridad acrosomal (%)
Secano	1	1,50 $\pm$ 1,32	179,00 $\pm$ 68,74	2,83 $\pm$ 0,29	85,00 $\pm$ 8,66	54,90 $\pm$ 3,16	49,32 $\pm$ 4,71	92,74 $\pm$ 3,86
	2	1,20 $\pm$ 0,26	162,67 $\pm$ 24,66	0,40 $\pm$ 0,17	67,57 $\pm$ 9,96 ^a	52,91 $\pm$ 1,96	49,29 $\pm$ 5,20 ^a	91,09 $\pm$ 2,41
	3	1,40 $\pm$ 0,17 ^a	175,33 $\pm$ 11,50	0,33 $\pm$ 0,15	53,63 $\pm$ 3,25 ^a	48,51 $\pm$ 4,31	79,44 $\pm$ 9,30	93,46 $\pm$ 4,38
	4	1,57 $\pm$ 0,75	110,67 $\pm$ 26,08	0,43 $\pm$ 0,12 ^a	83,63 $\pm$ 8,27	54,48 $\pm$ 2,68	94,09 $\pm$ 3,48	93,38 $\pm$ 3,08 ^a
	5	1,17 $\pm$ 0,29	105,33 $\pm$ 23,44	0,33 $\pm$ 0,29	67,90 $\pm$ 11,39	52,63 $\pm$ 6,25	50,92 $\pm$ 5,94	94,09 $\pm$ 1,97
	6	1,07 $\pm$ 0,12	165,67 $\pm$ 41,36	0,57 $\pm$ 0,12 ^a	59,50 $\pm$ 1,93	51,71 $\pm$ 4,53	53,05 $\pm$ 6,09	94,83 $\pm$ 0,29
	7	3,00 $\pm$ 1,18	54,00 $\pm$ 13,53	2,83 $\pm$ 1,44	53,30 $\pm$ 6,06	50,14 $\pm$ 6,59	70,99 $\pm$ 8,60	91,65 $\pm$ 2,25
	8	2,10 $\pm$ 1,23	54,67 $\pm$ 8,96	1,67 $\pm$ 0,58	55,07 $\pm$ 3,07	59,99 $\pm$ 5,11 ^a	67,08 $\pm$ 9,17	92,27 $\pm$ 5,94
Lluvia	1	1,93 $\pm$ 0,12	164,33 $\pm$ 15,04	1,67 $\pm$ 0,58	60,73 $\pm$ 3,04	53,37 $\pm$ 2,36	40,57 $\pm$ 5,91	95,30 $\pm$ 1,52
	2	1,43 $\pm$ 0,40	167,33 $\pm$ 7,51	0,00 $\pm$ 0,00	91,00 $\pm$ 9,54 ^b	48,97 $\pm$ 7,46	74,26 $\pm$ 7,77 ^b	97,67 $\pm$ 2,83
	3	0,37 $\pm$ 0,21 ^b	149,00 $\pm$ 41,22	0,17 $\pm$ 0,29	91,87 $\pm$ 9,41 ^b	53,81 $\pm$ 4,45	82,55 $\pm$ 8,76	95,20 $\pm$ 3,11
	4	0,97 $\pm$ 0,46	162,67 $\pm$ 48,19	0,07 $\pm$ 0,12 ^b	63,97 $\pm$ 16,44	53,19 $\pm$ 1,50	93,71 $\pm$ 2,82	98,40 $\pm$ 1,98 ^b
	5	0,93 $\pm$ 0,31	93,33 $\pm$ 21,55	0,17 $\pm$ 0,29	53,90 $\pm$ 3,58	46,65 $\pm$ 8,13	60,29 $\pm$ 3,09	93,56 $\pm$ 3,48
	6	1,37 $\pm$ 0,51	140,00 $\pm$ 33,15	0,07 $\pm$ 0,12 ^b	59,33 $\pm$ 3,67	52,56 $\pm$ 3,20	34,69 $\pm$ 2,09	94,60 $\pm$ 2,58
	7	1,83 $\pm$ 0,65	54,33 $\pm$ 7,23	2,67 $\pm$ 0,58	71,37 $\pm$ 6,82	55,44 $\pm$ 7,32	50,83 $\pm$ 5,00	88,50 $\pm$ 0,60
	8	2,03 $\pm$ 1,76	106,00 $\pm$ 42,14	2,50 $\pm$ 0,87	61,43 $\pm$ 15,89	48,02 $\pm$ 6,54 ^b	41,99 $\pm$ 8,22	92,29 $\pm$ 7,02

Los subíndices muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) de cada individuo en ambas épocas.

4.2. Análisis de proteínas en el plasma seminal

4.2.1. Concentración total de proteína en época de secano y lluvias

Tabla 5. Media $\pm$ DS de la comparación de la concentración total de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) del plasma seminal de alpaca entre individuos (columna) y entre épocas (filas) ($n=8$, $r=3$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

N° alpaca	Secano	Lluvia
1	11,35 $\pm$ 3,15 ^{bc}	10,15 $\pm$ 2,25
2	5,52 $\pm$ 0,64 ^c	12,51 $\pm$ 4,44
3 ^y	9,39 $\pm$ 1,91 ^{bc}	12,53 $\pm$ 1,79
4	14,09 $\pm$ 2,50 ^{ab}	17,02 $\pm$ 6,78
5	18,58 $\pm$ 1,29 ^a	14,39 $\pm$ 5,56
6 ^y	11,19 $\pm$ 2,70 ^{bc}	16,03 $\pm$ 3,05
7	15,32 $\pm$ 2,10 ^{ab}	16,17 $\pm$ 2,44
8	11,67 $\pm$ 2,56 ^{bc}	12,77 $\pm$ 1,31
MEDIA $\pm$ DS	12,14 $\pm$ 4,20	13,95 $\pm$ 3,96

Los subíndices en la misma columna *a*, *b* y *c* muestran diferencia significativa ($p<0,05$) entre individuos y el superíndice *y* en la misma fila muestra diferencia significativa ($p<0,05$) en las dos épocas.

4.2.2. Número y frecuencia de proteínas expresadas en época de secano

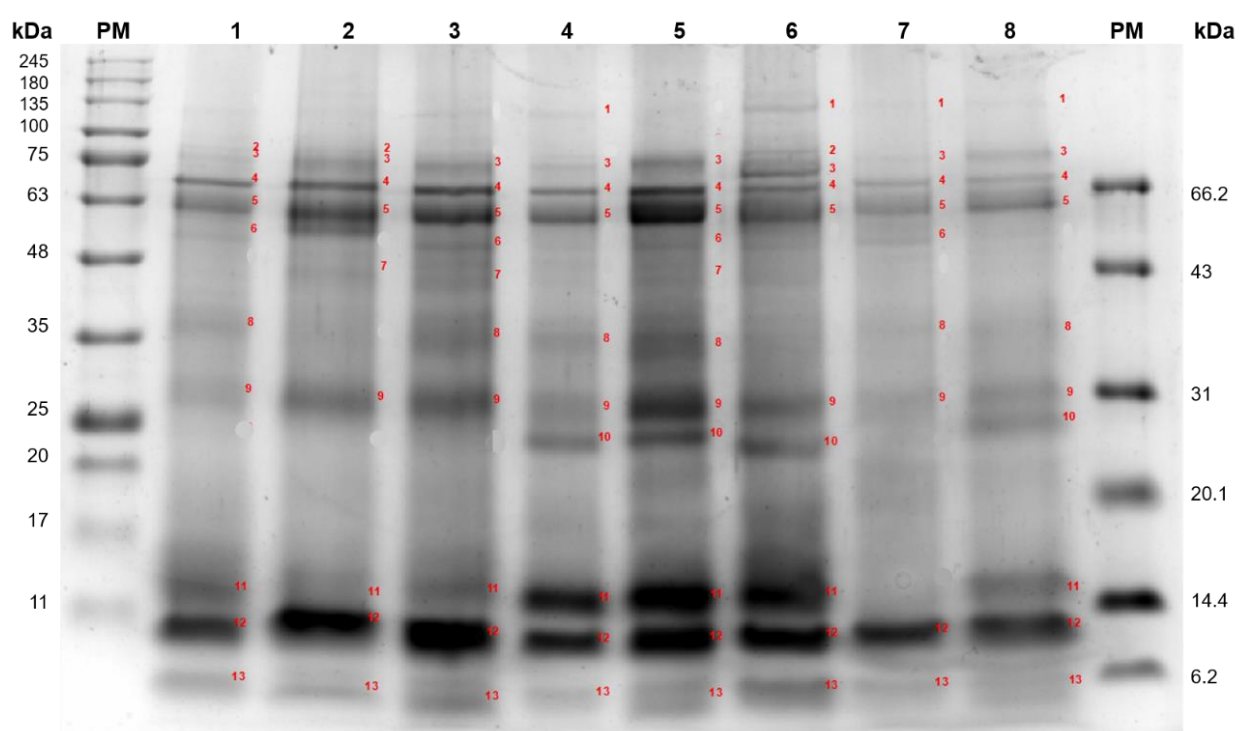


Figura 13. Electroforegrama 1D-SDS-PAGE del plasma seminal de alpaca en época de secano. A los extremos se ubican los marcadores moleculares (PM) de amplio y menor rango. Cada carril corresponde a un macho (n=8). Los números en rojo indican el número de banda. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

Tabla 6. Perfil electroforético 1D-SDS-PAGE de bandas presentes en el plasma seminal de alpaca en época de secano (n=8; r=3). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

N° banda	PM (kDa)	ID alpaca								Frecuencia (n)
		1	2	3	4	5	6	7	8	
1	122,54 ± 2,56	-	-	-	+	-	+	+	+	4
2	82,17 ± 1,82	+	+	-	-	-	+	-	-	3
3	73,48 ± 1,40	+	+	+	+	+	+	+	+	8
4	66,92 ± 1,02	+	+	+	+	+	+	+	+	8
5	59,71 ± 0,73	+	+	+	+	+	+	+	+	8
6	50,44 ± 1,12	+	-	+	-	+	-	+	-	4
7	42,27 ± 0,55	-	+	+	-	+	-	-	-	3
8	36,32 ± 0,60	+	-	+	+	+	-	+	+	6
9	29,61 ± 0,62	+	+	+	+	+	+	+	+	8
10	25,97 ± 0,80	-	-	-	+	+	+	-	+	4
11	14,71 ± 0,31	+	+	+	+	+	+	-	+	7
12	10,17 ± 0,67	+	+	+	+	+	+	+	+	8
13	6,28 ± 0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	8
Σ Bandas		10	9	10	10	11	10	9	10	

PM (peso molecular); + (presencia de banda); - (ausencia de banda)

4.2.3. Número y frecuencia de proteínas expresadas en época de lluvias

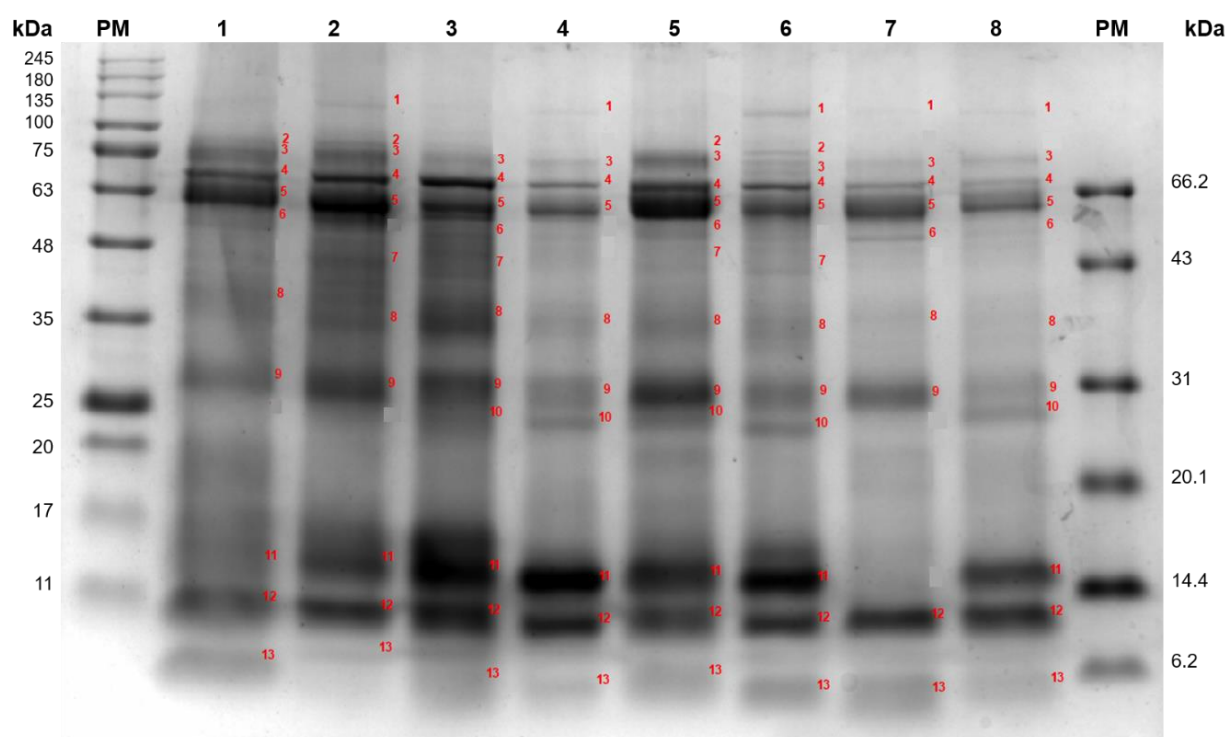


Figura 14. Electroforegrama 1D-SDS-PAGE del plasma seminal de alpaca en época de lluvias. A los extremos se ubican los marcadores moleculares (PM) de amplio y menor rango. Cada carril corresponde a un macho (n=8). Los números en rojo indican el número de banda. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

Tabla 7. Perfil electroforético 1D-SDS-PAGE de bandas presentes en el plasma seminal de alpaca en época de lluvias (n=8; r=3). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

N° banda	PM (kDa)	ID alpaca								Frecuencia (n)
		1	2	3	4	5	6	7	8	
1	122,54 ± 2,56	-	+	-	+	-	+	+	+	5
2	82,17 ± 1,82	+	+	-	-	-	+	-	-	3
3	73,48 ± 1,40	+	+	+	+	+	+	+	+	8
4	66,92 ± 1,02	+	+	+	+	+	+	+	+	8
5	59,71 ± 0,73	+	+	+	+	+	+	+	+	8
6	50,44 ± 1,12	+	-	+	-	+	-	+	+	5
7	42,27 ± 0,55	-	+	+	-	+	+	-	-	4
8	36,32 ± 0,60	+	+	+	+	+	+	+	+	8
9	29,61 ± 0,62	+	+	+	+	+	+	+	+	8
10	25,97 ± 0,80	-	-	+	+	+	+	-	+	5
11	14,71 ± 0,31	+	+	+	+	+	+	-	+	7
12	10,17 ± 0,67	+	+	+	+	+	+	+	+	8
13	6,28 ± 0,12	+	+	+	+	+	+	+	+	8
Σ Bandas		10	11	11	10	11	12	9	11	

PM (peso molecular); + (presencia de banda); - (ausencia de banda)

4.2.4. Concentración relativa de proteínas en época de secano y lluvias

Tabla 8. Media $\pm$ DS de la comparación de la concentración relativa de las bandas identificadas en el plasma seminal de alpaca en época de secano y lluvias (n=8; r=3). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

N° banda	PM (kDa)	Frecuencia (n)	Concentración relativa (%)	
			Secano	Lluvia
1	122,54 $\pm$ 2,56	4	0,63 $\pm$ 0,17	0,46 $\pm$ 0,28
2	82,17 $\pm$ 1,82	3	1,10 $\pm$ 0,22	1,21 $\pm$ 0,35
3	73,48 $\pm$ 1,40	8	3,37 $\pm$ 1,21	3,51 $\pm$ 1,43
4	66,92 $\pm$ 1,02	8	4,84 $\pm$ 0,97	5,21 $\pm$ 1,63
5	59,71 $\pm$ 0,73	8	11,21 $\pm$ 1,96	12,36 $\pm$ 2,62
6	50,44 $\pm$ 1,12	4	2,83 $\pm$ 0,91	2,64 $\pm$ 0,57
7	42,27 $\pm$ 0,55	3	1,42 $\pm$ 0,52	1,79 $\pm$ 1,17
8	36,32 $\pm$ 0,60	6	2,88 $\pm$ 0,46	4,85 $\pm$ 2,26
9	29,61 $\pm$ 0,62	8	5,91 $\pm$ 1,46 ^a	7,83 $\pm$ 2,21 ^b
10	25,97 $\pm$ 0,80	4	2,99 $\pm$ 0,94	3,69 $\pm$ 0,38
11	14,71 $\pm$ 0,31	7	24,27 $\pm$ 7,00	30,91 $\pm$ 5,79
12	10,17 $\pm$ 0,67	8	35,49 $\pm$ 9,42 ^a	25,74 $\pm$ 8,55 ^b
13	6,28 $\pm$ 0,12	8	13,32 $\pm$ 3,08 ^a	10,07 $\pm$ 5,04 ^b

Los subíndices muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) entre épocas.
PM (peso molecular)

Tabla 9. Media $\pm$ DS de la comparación de la concentración relativa (%) de las bandas de proteínas de cada macho en época de secano y lluvias (n=8, r=3). INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

Época	N° alpaca	Bandas							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Secano	1		0,86 $\pm$ 0,61 ^a	1,66 $\pm$ 0,77 ^a	4,81 $\pm$ 0,33	9,49 $\pm$ 1,34	2,16 $\pm$ 0,29		3,02 $\pm$ 1,28
	2		1,28 $\pm$ 0,29	5,17 $\pm$ 1,96	6,12 $\pm$ 0,17	15,41 $\pm$ 0,58		1,98 $\pm$ 0,40	
	3			3,93 $\pm$ 0,81	6,00 $\pm$ 2,15	11,57 $\pm$ 1,29	3,21 $\pm$ 0,55	1,34 $\pm$ 0,49	2,36 $\pm$ 0,44 ^a
	4	0,42 $\pm$ 0,20		2,47 $\pm$ 1,00	4,32 $\pm$ 1,08	9,37 $\pm$ 1,77			2,41 $\pm$ 0,62
	5			4,05 $\pm$ 1,73	5,10 $\pm$ 0,69	11,02 $\pm$ 2,84	2,03 $\pm$ 0,58	0,95 $\pm$ 0,61	3,59 $\pm$ 0,96
	6	0,71 $\pm$ 0,21	1,17 $\pm$ 0,21 ^a	4,49 $\pm$ 0,61	4,37 $\pm$ 0,94	10,58 $\pm$ 0,70			
	7	0,81 $\pm$ 0,14		2,66 $\pm$ 1,40	4,89 $\pm$ 0,61	12,20 $\pm$ 1,99	3,94 $\pm$ 1,11		3,06 $\pm$ 1,12 ^a
	8	0,58 $\pm$ 0,27		2,54 $\pm$ 0,91	3,10 $\pm$ 0,67	10,06 $\pm$ 1,14			2,83 $\pm$ 0,69
Lluvia	1		1,41 $\pm$ 0,19 ^b	5,20 $\pm$ 0,68 ^b	6,41 $\pm$ 1,32	11,35 $\pm$ 1,94	2,54 $\pm$ 0,36		2,98 $\pm$ 0,31
	2	0,20 $\pm$ 0,07	1,42 $\pm$ 0,50	4,53 $\pm$ 0,65	6,95 $\pm$ 1,34	17,63 $\pm$ 2,52		2,22 $\pm$ 1,38	2,67 $\pm$ 1,01
	3			1,77 $\pm$ 0,27	7,03 $\pm$ 0,85	9,91 $\pm$ 0,40	2,91 $\pm$ 1,16	2,69 $\pm$ 0,36	9,31 $\pm$ 2,69 ^b
	4	0,19 $\pm$ 0,06		4,70 $\pm$ 3,48	3,53 $\pm$ 0,62	11,68 $\pm$ 0,4			4,19 $\pm$ 1,89
	5			4,56 $\pm$ 1,23	6,39 $\pm$ 0,77	13,60 $\pm$ 0,95	1,89 $\pm$ 0,22	0,47 $\pm$ 0,1	4,33 $\pm$ 1,87
	6	0,63 $\pm$ 0,29	0,71 $\pm$ 0,17 ^b	3,36 $\pm$ 1,16	3,88 $\pm$ 0,47	11,07 $\pm$ 0,99		0,71 $\pm$ 0,14	3,03 $\pm$ 0,13
	7	0,77 $\pm$ 0,98		2,36 $\pm$ 0,69	4,23 $\pm$ 1,02	13,90 $\pm$ 6,90	3,22 $\pm$ 0,70		3,64 $\pm$ 0,96 ^b
	8	0,24 $\pm$ 0,15		1,62 $\pm$ 0,86	3,22 $\pm$ 0,29	9,71 $\pm$ 2,80	2,14 $\pm$ 0,09		4,62 $\pm$ 1,29

Los subíndices muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) de cada individuo en ambas épocas.

Tabla 9. Media $\pm$ DS de la comparación de la concentración relativa (%) de las bandas de proteínas de cada macho en época de secano y lluvias (n=8, r=3). INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.

Época	N° alpaca	bandas				
		9	10	11	12	13
Secano	1	5,26 $\pm$ 1,05		26,27 $\pm$ 4,83	34,50 $\pm$ 6,30	14,59 $\pm$ 6,96
	2	7,63 $\pm$ 1,76		12,00 $\pm$ 1,77 ^a	43,47 $\pm$ 3,82 ^a	8,96 $\pm$ 1,97
	3	6,17 $\pm$ 1,81		18,34 $\pm$ 3,93	33,91 $\pm$ 4,68 ^a	14,24 $\pm$ 3,27
	4	5,16 $\pm$ 0,58	2,70 $\pm$ 1,42	33,51 $\pm$ 4,92	27,90 $\pm$ 5,97	12,17 $\pm$ 4,18
	5	7,45 $\pm$ 0,68	2,24 $\pm$ 0,82	26,71 $\pm$ 2,76	25,88 $\pm$ 6,56	9,85 $\pm$ 3,13
	6	6,70 $\pm$ 1,42	4,38 $\pm$ 2,06	25,47 $\pm$ 7,35	27,12 $\pm$ 9,55	16,74 $\pm$ 4,00
	7	5,78 $\pm$ 0,16			53,64 $\pm$ 8,64	17,68 $\pm$ 0,17
	8	3,10 $\pm$ 1,58	2,67 $\pm$ 0,94	27,59 $\pm$ 7,07	37,54 $\pm$ 3,12 ^a	12,34 $\pm$ 0,52 ^a
Lluvia	1	5,73 $\pm$ 1,21		20,26 $\pm$ 2,05	31,24 $\pm$ 3,17	11,47 $\pm$ 1,25
	2	10,08 $\pm$ 0,32		29,10 $\pm$ 5,76 ^b	23,66 $\pm$ 0,67 ^b	3,75 $\pm$ 1,63
	3	7,26 $\pm$ 1,21	1,97 $\pm$ 0,13	31,88 $\pm$ 4,74	18,73 $\pm$ 1,45 ^b	7,36 $\pm$ 1,75
	4	8,35 $\pm$ 1,75	4,25 $\pm$ 1,60	36,36 $\pm$ 4,49	20,73 $\pm$ 2,85	7,79 $\pm$ 1,53
	5	10,58 $\pm$ 0,82	3,64 $\pm$ 1,18	27,97 $\pm$ 4,59	18,75 $\pm$ 0,79	9,24 $\pm$ 2,12
	6	5,79 $\pm$ 1,00	3,46 $\pm$ 1,01	33,91 $\pm$ 5,77	21,25 $\pm$ 4,33	12,56 $\pm$ 3,09
	7	9,86 $\pm$ 7,05			43,91 $\pm$ 6,69	20,62 $\pm$ 4,83
	8	4,97 $\pm$ 0,16	3,42 $\pm$ 0,32	36,91 $\pm$ 4,57	27,66 $\pm$ 2,50 ^b	7,76 $\pm$ 0,65 ^b

Los subíndices muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) de cada individuo en ambas épocas.

4.3. Análisis de la correlación de proteínas del plasma seminal y la calidad seminal en ambas épocas

Tabla 10. Índices de correlación entre las bandas de proteínas del plasma seminal y calidad del semen fresco de alpaca en ambas épocas (n=8). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

Época	Bandas			Calidad seminal				
	N°	PM (kDa)	Frecuencia (n)	Filancia	Movilidad	Integridad de membrana	Funcionalidad de membrana	Integridad acrosomal
Secano	3	73,48 ± 1,40	8	r = - 0,73*				
	4	66,92 ± 1,02	8			r = - 0,76*		
	8	36,32 ± 0,60	6				r = - 0,82*	
	9	29,61 ± 0,62	8			r = - 0,69*		
	12	10,17 ± 0,67	8					r = - 0,85**
Lluvia	6	50,44 ± 1,12	5			r = 0,96**		
	7	42,27 ± 0,55	4		r = 0,99*			
	12	10,17 ± 0,67	8	r = 0,85**				r = - 0,72*
	13	6,28 ± 0,12	4					r = - 0,79*

PM (peso molecular); r (correlación de Pearson)

*Correlación significativa ($p < 0,05$); **Correlación significativa ($p < 0,01$)

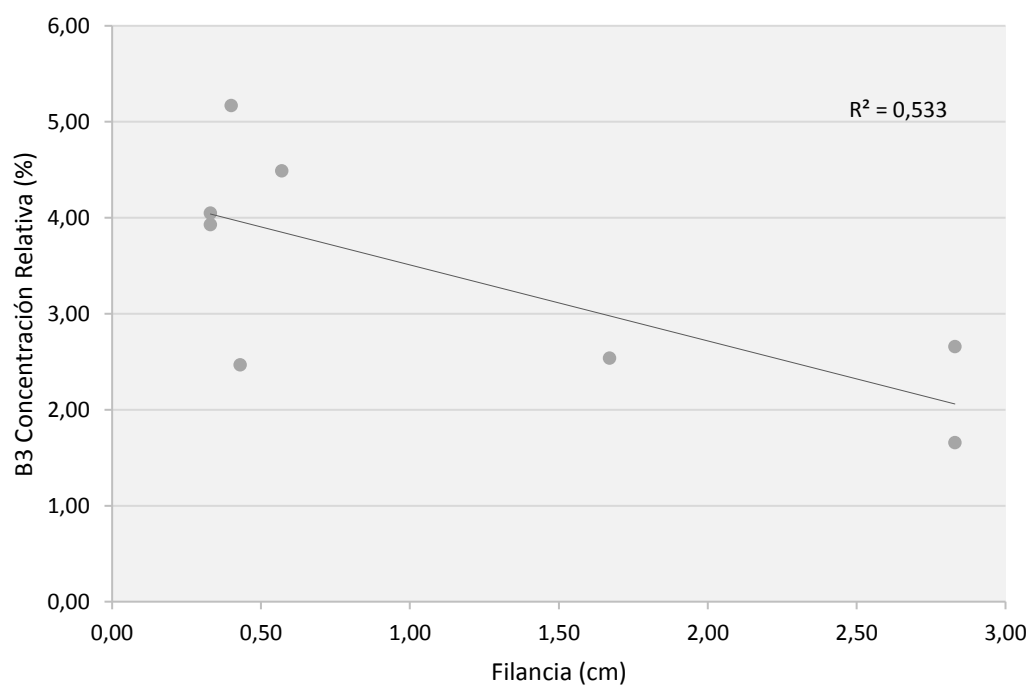


Figura 15. Correlación de Pearson (r) de la banda 3 de 73,5 kDa del plasma seminal y la filancia del semen fresco de alpaca en época de secano ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

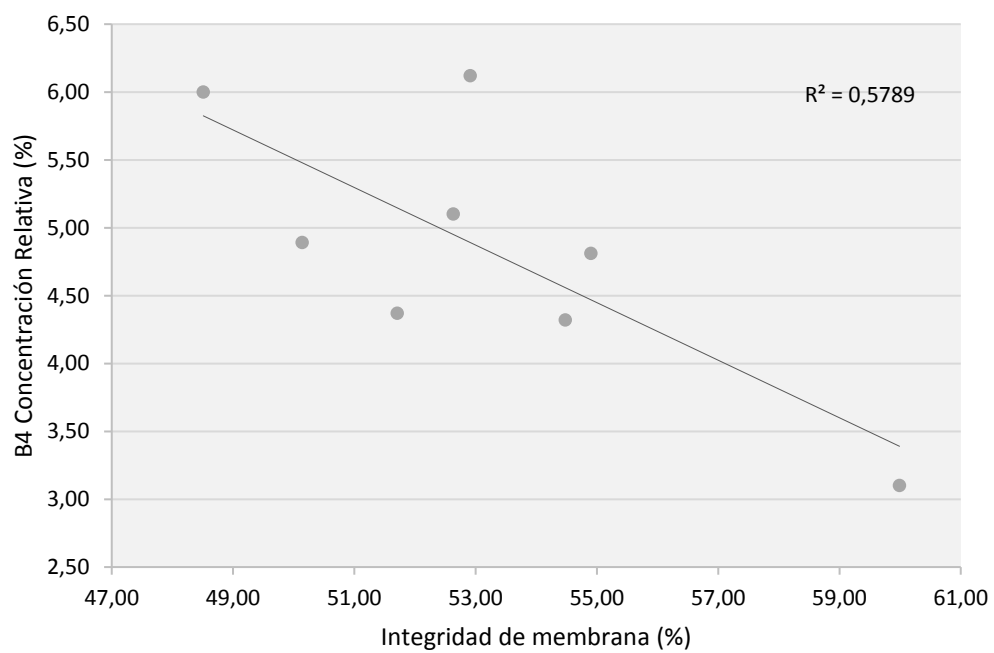


Figura 16. Correlación de Pearson (r) de la banda 4 de 66,9 kDa del plasma seminal y la integridad de membrana espermática del semen fresco de alpaca en época de secano ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

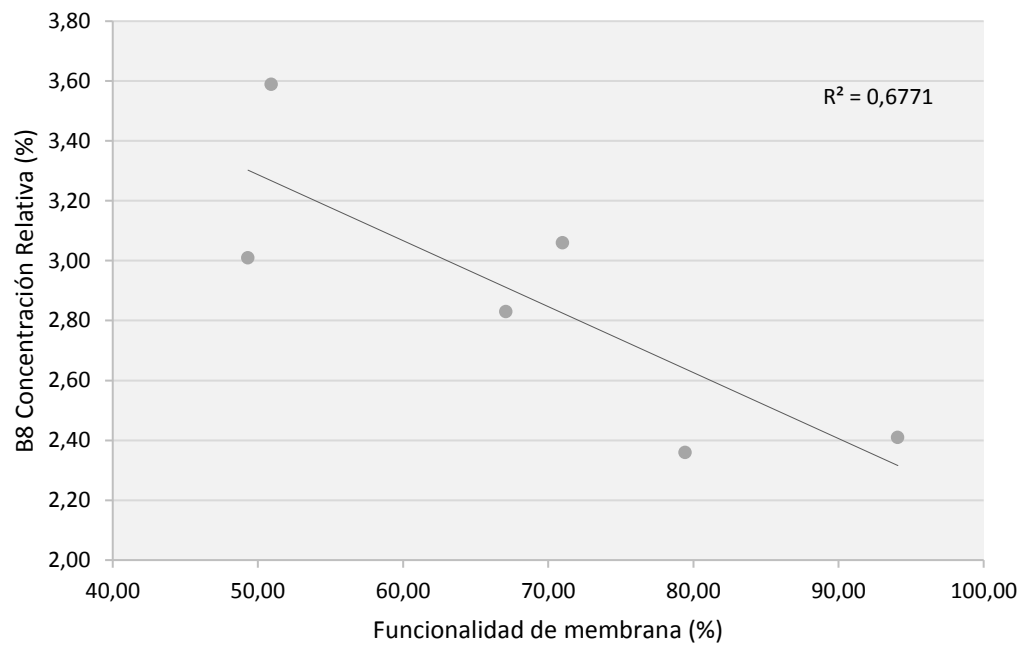


Figura 17. Correlación de Pearson (r) de la banda 8 de 36,3 kDa del plasma seminal y la funcionalidad de membrana espermática del semen fresco de alpaca en época de secano ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

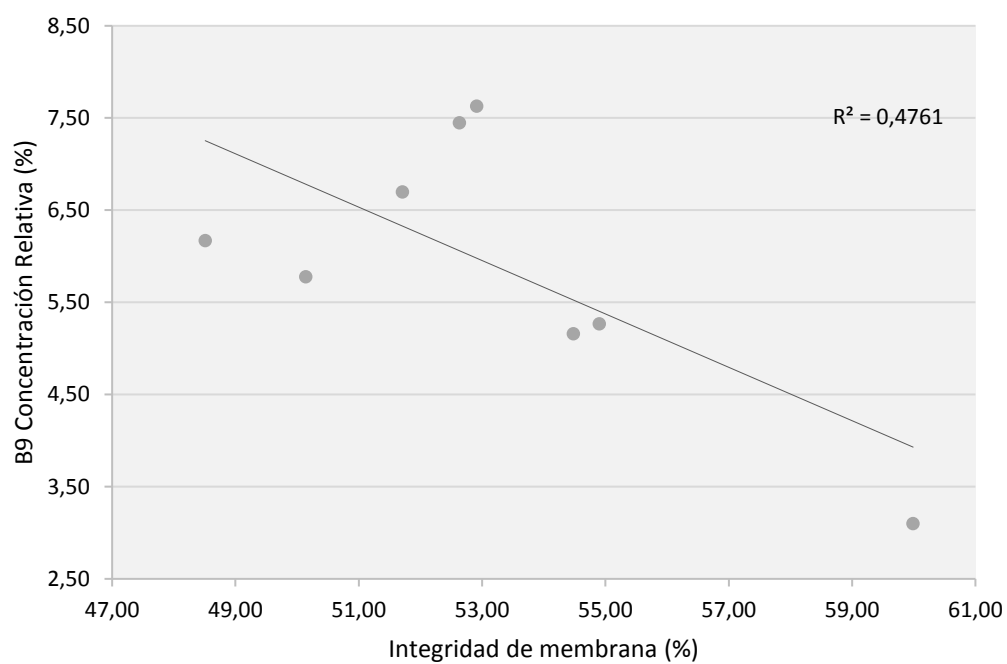


Figura 18. Correlación de Pearson (r) de la banda 9 de 29,6 kDa del plasma seminal y la integridad de membrana espermática del semen fresco de alpaca en época de secado ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

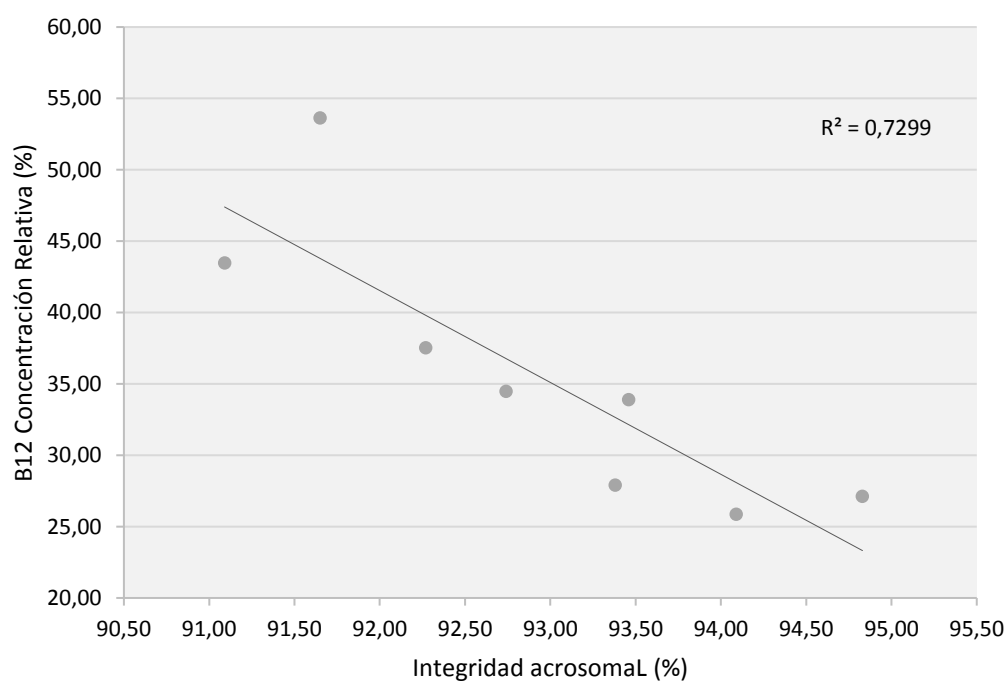


Figura 19. Correlación de Pearson (r) de la banda 12 de 10,2 kDa del plasma seminal y la integridad de membrana espermática del semen fresco de alpaca en época de secado ($p < 0,01$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

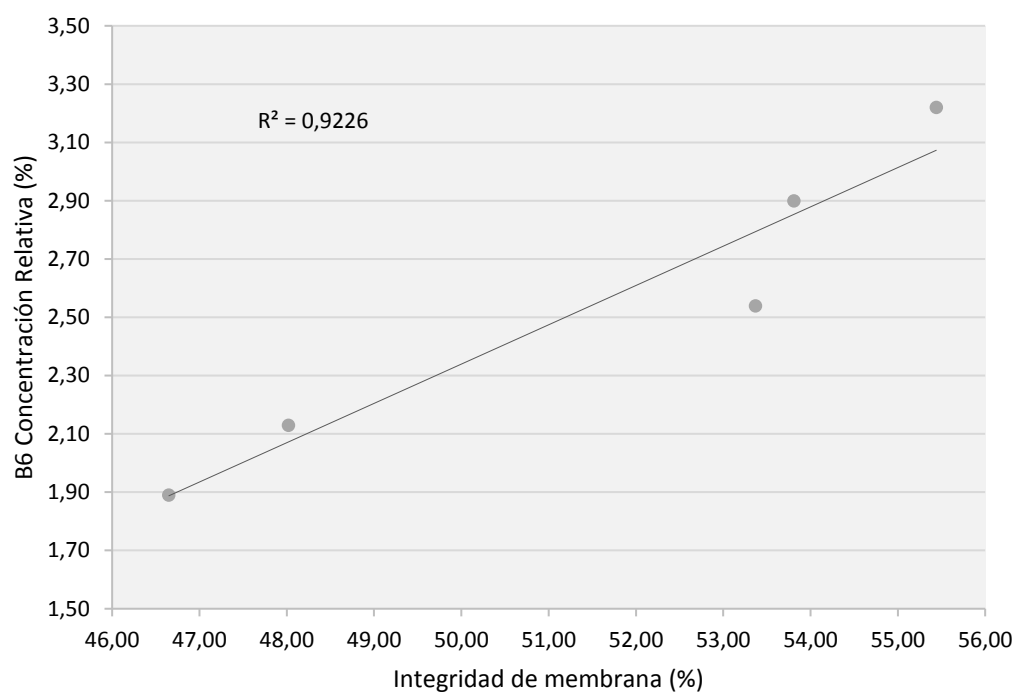


Figura 20. Correlación de Pearson (r) de la banda 6 de 50,4 kDa del plasma seminal y la integridad de membrana espermática del semen fresco de alpaca en época de lluvias ($p < 0,01$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

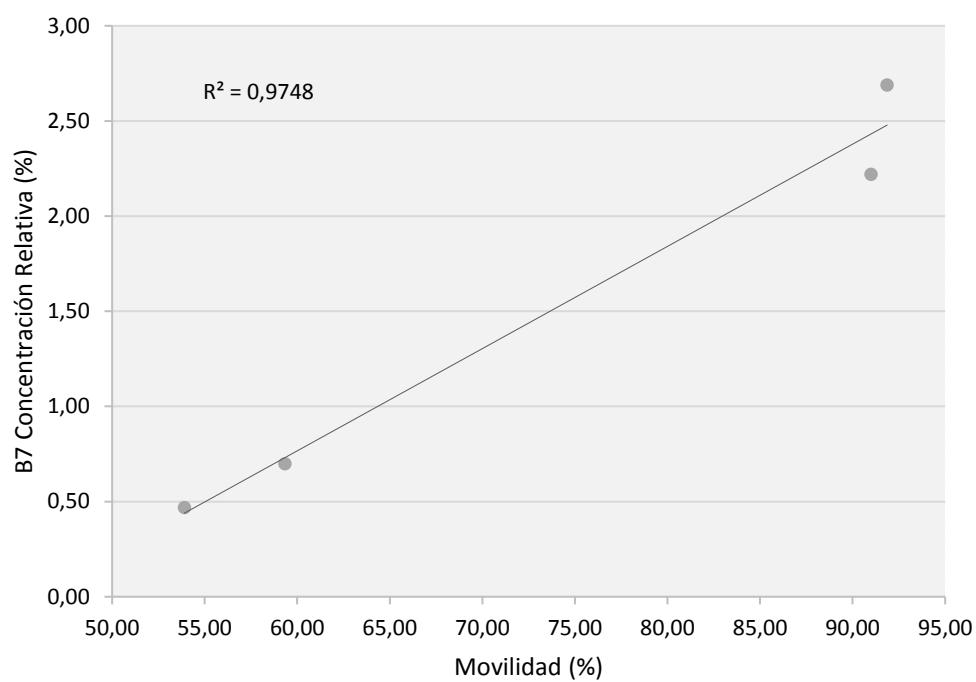


Figura 21. Correlación de Pearson (r) de la banda 7 de 42,3 kDa del plasma seminal y la movilidad espermática del semen fresco de alpaca en época de lluvias ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

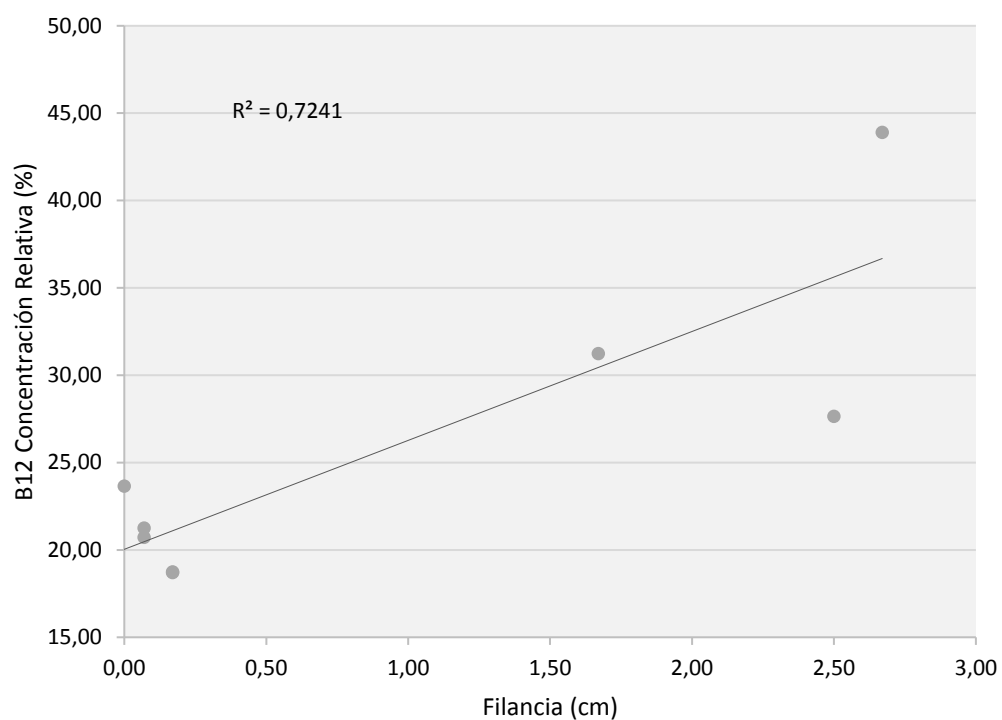


Figura 22. Correlación de Pearson (r) de la banda 12 de 10,2 kDa del plasma seminal y la filancia del semen fresco de alpaca en época de lluvias ($p < 0,01$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

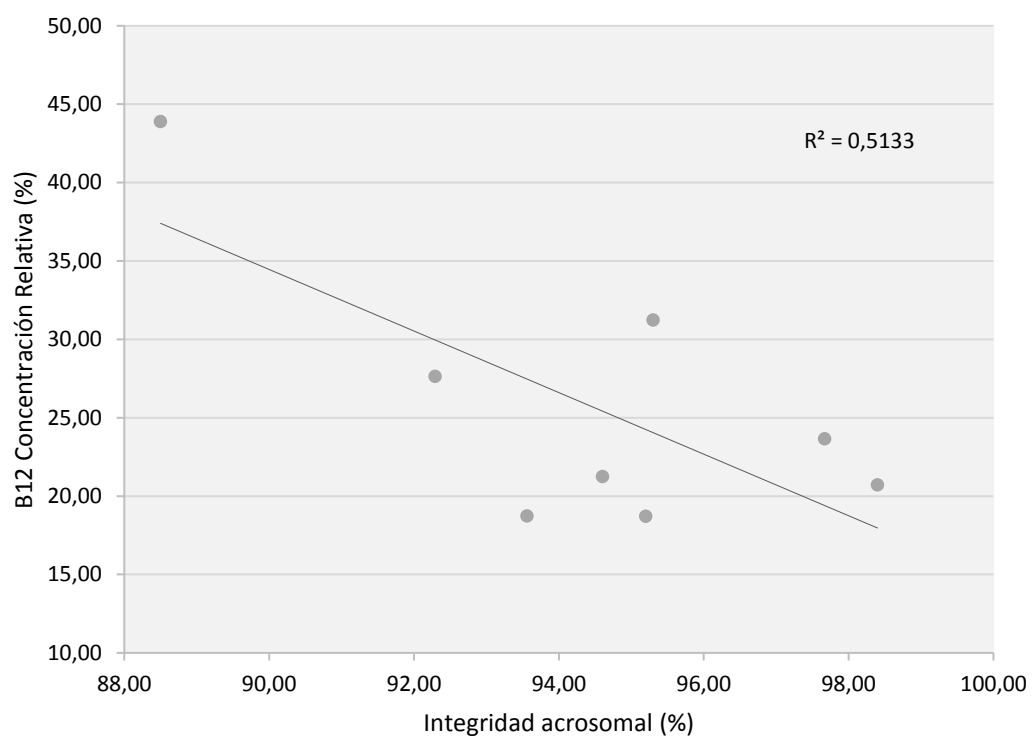


Figura 23. Correlación de Pearson (r) de la banda 12 de 10,2 kDa del plasma seminal y la integridad acrosomal espermática del semen fresco de alpaca en época de lluvias ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

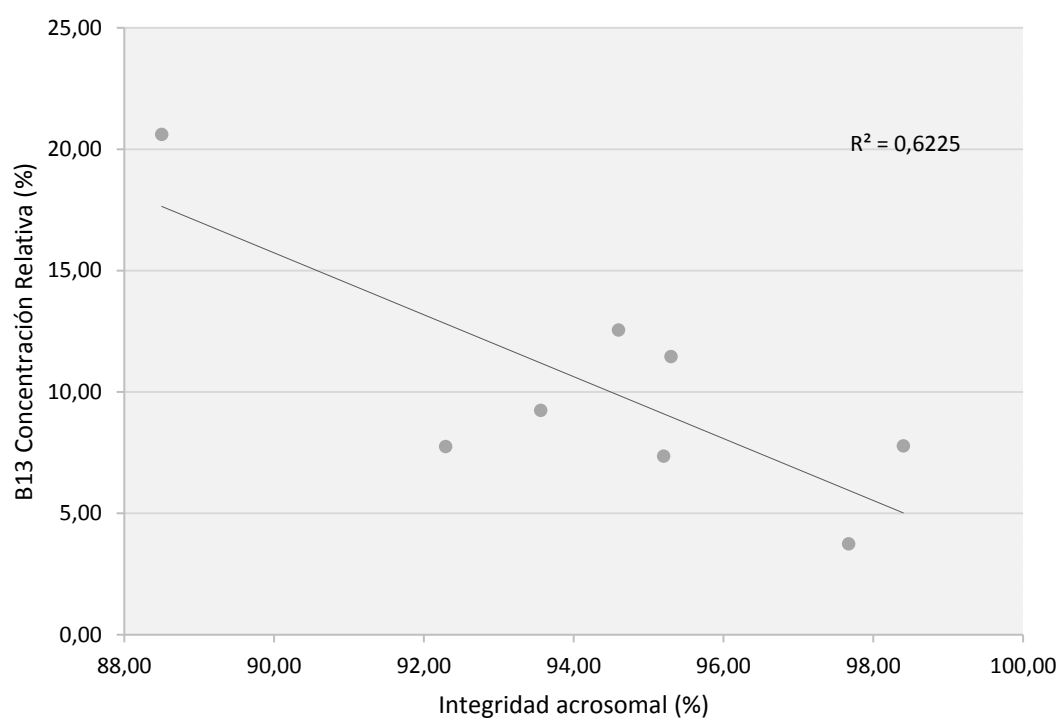


Figura 24. Correlación de Pearson (r) de la banda 13 de 6,3 kDa del plasma seminal y la integridad acrosomal espermática del semen fresco de alpaca en época de lluvias ($p < 0,05$). Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.

V. DISCUSIONES

5.1. Análisis de calidad seminal

De acuerdo a los resultados de calidad seminal evaluado en las 8 alpacas macho, el volumen e integridad de membrana no muestran diferencia significativa entre individuos en ninguna época de estudio ($p>0.05$) (Tablas 1 y 2); el volumen promedio reportado fue de $1,63 \pm 0,19$ mL en la época de secano y $1,36 \pm 0,17$ en la época de lluvia. En el estudio reportado por Huanca et al. (2011), se obtiene un promedio de $1,12 \pm 1,10$ de volumen en la época de secano y $1,28 \pm 1,19$ mL en la época de lluvia, los cuales son similares a los reportados en el presente trabajo de investigación, dado que se utilizó el mismo método de colecta de semen y se realizó en la misma estación del año. La integridad de membrana evaluada con el reactivo ioduro de propidio y Hoechst 33342, fue de $53,16 \pm 1,04$ en la época de secano y $51,37 \pm 1,15$ en lluvias, así como lo reportado por Cueva (2018), quien obtuvo un promedio de 61,48% con valor máximo de 73,00% y mínimo de 57,27%.

Sin embargo, los parámetros de concentración espermática, filancia, movilidad, funcionalidad de membrana e integridad acrosomal, muestran diferencia significativa ($p<0,05$) entre individuos (Tablas 1 y 2), esta variabilidad también fue reportada por Huanca et al. (2011) y Morton et al. (2008), considerando igualmente que no siempre se pudo obtener muestras aptas para evaluación de un mismo macho durante todo el estudio, debido a la falta de libido del animal, la obtención de solo plasma seminal o muestras contaminadas con residuos de tierra por la dificultad de acomodarse al maniquí que contiene la vagina artificial; observándose una situación similar cuando se obtuvieron muestras de semen por electroeyaculación (Giuliano et al., 2008).

El análisis comparativo de ambas épocas que se reporta en la Tabla 3, no muestra diferencia significativa ($p>0,05$) en ningún parámetro de calidad seminal, lo cual es concordante con los resultados obtenidos por Huanca et al. (2011) quienes mencionan que la estación influye solo en la morfología y morfometría de los espermatozoides. Como también se reporta en llamas, donde se presentó diferencias significativas ($p<0,05$) en la anormalidad de la cola del espermatozoide (Giuliano et al., 2008) y otras especies como bovinos tampoco presentaron diferencias ($p>0,05$) en la movilidad espermática durante temporadas de invierno, verano y lluvia (Lima Verde et al., 2020).

Sin embargo, Giuliano et al. (2008) en su trabajo con llamas reporta disminución significativa ($p<0,05$) de la concentración espermática ($20,96 \pm 25,31 \times 10^6/\text{mL}$ en la época de invierno y $71,71 \pm 88,43 \times 10^6/\text{mL}$ en la época de verano) en la temporada de verano (donde la temperatura ambiental máxima fue de $28,6^\circ\text{C}$), esto debido a que el incremento de temperatura en los testículos produce degeneración espermática y disminución de la espermatogénesis; no obstante en el presente trabajo la temperatura máxima reportada en ambas épocas no fue muy variable, la época de secano (agosto y septiembre) se reportó $26,25 \pm 0,39^\circ\text{C}$ y en la época de lluvia (noviembre y diciembre) $25,95 \pm 0,58^\circ\text{C}$, esta diferencia no fue significativa para alterar la concentración espermática en semen de alpacas, ya que se reportó $127,17 \pm 11,29 \text{ Mill/mL}$ de espermatozoides en la época de secano y $129,63 \pm 9,58 \text{ Mill/mL}$ en la época de lluvia (Tabla 3).

Por otro lado, Villanueva et al. (2018) evaluó la calidad seminal de 4 alpacas en la época de verano (temperatura máxima de $30,00^\circ\text{C}$) y la época de invierno (temperatura máxima de $24,00^\circ\text{C}$), donde obtuvo filancia de $5,9 \pm 3,4 \text{ cm}$ y $3,7 \pm 2,0 \text{ cm}$ para época de verano e invierno respectivamente siendo superior a lo reportado en el presente trabajo de investigación ($1,18 \pm 0,24$ y $0,91 \pm 0,24$ para época de secano y lluvia, respectivamente), posiblemente debido a mecanismos de protección del plasma seminal sobre la calidad de los espermatozoides, según lo señala Troedsson et al. (2005). Así también, Villanueva et al. (2018) reportó el aumento de la movilidad (de $58,0 \pm 22,1\%$ a $77,3 \pm 11,6\%$) en la época de lluvia, estos resultados no coinciden con lo reportado en el presente trabajo, sin embargo al realizar el análisis de comparación individual en ambas épocas como se muestra en la Tabla 4, se puede observar diferencias significativas ($p<0,05$) en dos individuos que mostraron disminución de la filancia ($0,43 \pm 0,07$ a $0,07 \pm 0,07$

y $0,57 \pm 0,07$ a $0,07 \pm 0,07$ cm) y aumento de movilidad ($67,57 \pm 5,75$ a $91,00 \pm 5,51$ y $53,63 \pm 1,88$ a $91,87 \pm 5,43$ %) en la época de lluvia, que es un patrón constante en el semen de alpacas e inicialmente se relacionó con la presencia de mucopolisacáridos o glucosaminoglicanos (Kershaw-Young, Evans, et al., 2012); no obstante, Kershaw-Young et al. (2013) sugiere que las proteínas estarían implicadas en la alta viscosidad seminal, aun así, la variación de temperatura en las épocas de estudio podrían no haber sido significativas para evidenciarse esta variación en los parámetros en todos los individuos evaluados.

Del mismo modo, la viabilidad espermática no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en la época de secano y lluvia, esto coincide con lo analizado en llamas, donde se evaluó la viabilidad espermática a través de la tinción eosina-nigrosina y no mostró diferencias en la época de verano y primavera, pero sí reportó variación significativa ($p < 0,05$) del volumen seminal, motilidad y concentración espermática, obteniendo mejores resultados en la época de primavera donde las temperaturas fueron de $13,4^{\circ}\text{C}$ a $16,8^{\circ}\text{C}$ (Ferré et al., 2015), así como un estudio a lo largo del año en camellos reveló que el volumen seminal, la concentración, movilidad y viabilidad espermática eran menores en los meses con temperaturas ambientales altas y los mejores eyaculados estaban asociados con el incremento de testosterona y libido, que se da en meses cuando el fotoperiodo es corto, no obstante, la morfología espermática no tubo variaciones durante el año (Al-Bulushi et al., 2019).

5.2. Análisis de proteínas en el plasma

El análisis de concentración total de proteínas en el plasma seminal de alpaca reportado en la Tabla 5, muestra que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre individuos solo en la época de secano siendo el valor mínimo de $5,52 \pm 0,37$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y máximo de $18,58 \pm 0,75$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sin embargo, la comparación en las dos épocas de estudio, muestra que la concentración total de proteínas solo varió significativamente ($p < 0,05$) en los machos 3 y 6, habiendo en ambos casos un aumento en la época de lluvia (de $9,39 \pm 1,10$ a $12,53 \pm 1,04$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de $11,19 \pm 1,56$ a $16,03 \pm 1,76$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); mientras que el promedio general de las 8 alpacas analizadas no muestra diferencia significativa ($p > 0,05$) en ambas épocas climáticas,

Por medio de electroforesis unidimensional SDS-PAGE se establecieron un total de 13 bandas de proteínas con distintos pesos moleculares en ambas épocas de estudio (de 122,5 kDa a 6,3 kDa), esto difiere a lo encontrado por Aisen (2021) que reportó 5 bandas (de 60, 25, 20, 14 y 13 kDa) en el plasma seminal de alpaca; sin embargo estos resultados no nos permiten identificar el número completo proteínas presentes, así como lo reportado Kershaw-Young & Maxwell (2011) donde se identificó un total de 89 proteínas del plasma seminal de alpaca mediante espectrometría de masas (MS/MS). En la época de secano (Figura 13 y Tabla 6), las bandas de 73,5; 66,9; 59,7; 29,6; 10,2 y 6,3 kDa fueron las más frecuentes (presentes en todos los individuos), seguido de las bandas de 36,3 kDa y 14,7 kDa que estuvieron presentes en 6 y 7 machos, respectivamente; mientras que las bandas menos frecuentes fueron de 122,5; 82,2; 50,4; 42,3 y 25,9 kDa que se presentaron en solo 4 o 3 machos. Por otro lado, en la época de lluvia (Figura 14 y Tabla 7), las bandas de 73,5; 66,9; 59,7; 36,3; 29,6; 10,2 y 6,3 kDa fueron las más frecuentes (presentes en todos los individuos), seguido de la banda de 14,7 kDa que estuvo presente en 7 machos, y las bandas de 122,5; 50,4 y 25,9 kDa se presentaron en 5 machos; mientras que las bandas menos frecuentes fueron de 82,2 y 42,3 kDa que estuvieron en solo 3 y 4 machos, respectivamente, esto difiere a lo reportado en bovinos (Barajas, 2013), donde se identificaron 3 bandas de proteínas presentes únicamente en la época con menos precipitación.

Sin embargo, al evaluar la concentración relativa de las 13 bandas identificadas en el presente trabajo (Tabla 8), las bandas de 29.61 kDa, 10.17 kDa y 6.28kDa mostraron diferencia significativa ($p<0,05$) en ambas épocas climáticas (Tabla 8); la banda de 29.61 kDa reportó un aumento en la época de lluvia (de 5.91% a 7.83%), mientras que las bandas de 10.17 kDa y 6.28kDa disminuyeron (de 35.49% a 25.74% y de 13.32% a 10.07%, respectivamente), estas bandas podrían estar relacionadas a la protección del espermatozoide ante el estrés térmico como las proteínas del shock calórico HSP60, HPS70 y HPS90 reportados en caprinos (Baraja-Vasquez et al., 2005), donde se demostró que la cantidad de estas proteínas están relacionados con el calor, la privación de agua y alimento, y participan en mecanismos de aclimatación y adaptación; asimismo, es el Kershaw-Young & Maxwell (2011) en su estudio de proteínas del plasma seminal de alpaca identificadas por MS/MS, reporta la presencia de una proteína *Heat shock* de 70 kDa. Aunque las bandas identificadas en el presente trabajo no son del mismo peso molecular, no es posible descartar la posibilidad debido a que podrían estar

presentes más proteínas en una sola banda y estas podrían haber sufrido proteólisis debido a la sensibilidad de la proteína frente a agregados resistentes al SDS como los reporta Kelly et al. (2006).

Las bandas de 14,7 y 10,2 kDa (Figuras 13 y 14) muestran el mismo patrón que las bandas de 14 y 13 kDa presentados por Aisen et al. (2021). La banda de 10 kDa presente en los 8 machos, tanto en época de secano y de lluvias, podría corresponder al Factor Inductor de la Ovulación (α -NGF), una proteína que en otros estudios de electroforesis bidimensional y MS/MS es referenciada con un peso molecular de 14 kDa; en el perfil electroforético esta banda muestra el mismo patrón que previos estudios en camélidos, así también constituye un 35,5 % (época de secano) y 25,7 % (época de lluvia) de cantidad del total de proteínas en la muestra (Tabla 8), siendo la proteína con mayor concentración, así como se reporta en alpacas (47,0%) y camellos (24,0%) (Druart et al., 2013; Kumar et al., 2013), esta elevada concentración en camélidos es debido a que esta proteína actúa como inducción de ovulación en hembras después de la eyaculación (Kershaw-Young, Druart, et al., 2012; Ratto et al., 2010), no obstante, en el presente estudio la cantidad de esta proteína se vio disminuida en la época de lluvia (noviembre y diciembre). Por otro lado, la proteína α -NGF (10,2 kDa) muestra una correlación negativa ($r = -0,85$ y $r = -0,72$) significativa ($p < 0,01$ y $p < 0,05$) en la época de secano y lluvia, respectivamente, con la integridad acrosomal espermática (Figura 19 y 23) y una correlación positiva ($r = 0,85$) significativa ($p < 0,01$) con la viscosidad espermática (Figura 22), esto se relaciona a los trabajos realizados en toros, donde se encontró a la proteína α -NGF localizada en la región de la cabeza y la cola de los espermatozoides mediante inmunofluorescencia, junto a la molécula TrkA; la cual es una molécula neurotrófica adherida al capuchón acrosomal, el núcleo y la cola del espermatozoides, e influye en las funciones reproductivas masculinas (Li et al., 2010), y se ve afectada por el aumento de concentración de la proteína α -NGF (Levanti et al., 2006).

La banda de 14,7 kDa presente en ambas épocas es la segunda proteína que se encuentra en mayor cantidad del total de proteínas en la muestra, reportándose 24,3 % en la época de secano y 30,9 % en la época de lluvia (Tabla 8), esta proteína podría corresponder a la proteína RSVP14 reportada en carneros con el peso molecular de 14 kDa y pertenece a la familia de las proteínas BSP, también

involucrada en la capacitación de los espermatozoides y la protección de la membrana espermática contra el choque térmico (Cardozo et al., 2008), esta proteína fue reportada anteriormente en alpacas (Aisen et al., 2021) y también en múltiples especies como jabalí, ciervos, toros, caballos y camellos (Druart et al., 2013).

De acuerdo a los análisis de correlación (Tabla 10), en la época de secano se observa una correlación negativa ($r = -0,82$) significativa ($p < 0,05$) de la banda de 36,3 kDa con la funcionalidad de membrana (Figura 17), la cual se valuó a partir de la prueba de HOST, así como también las proteínas de 66,9 kDa y 29,6 kDa mostraron una correlación negativa ($r = -0,76$ y $r = -0,69$) significativa ($p < 0,05$) con la integridad de membrana (Figuras 16 y 18), estas proteínas indican una posible interacción negativa con el plasmalema de la célula espermática, contrario a lo que reporta Aisen et al. (2021), donde la adición del plasma seminal en muestras seminales después del proceso de congelación-descongelación mejora la conservación de la funcionalidad de membrana; sin embargo, esta interacción positiva puede estar asociada a la banda de 50,4 kDa que en la época de lluvia mostró una correlación positiva ($r = 0,99$) significativa ($p < 0,01$) (Figura 20) con la integridad de membrana espermática evaluada por la tinción de Hoechst 33342 e Ioduro de Propidio. Las correlaciones reportadas en el presente trabajo sugieren la relación de las proteínas del plasma seminal y la calidad del semen; no obstante, es importante que posteriormente (con el uso de otras técnicas) se realice la identificación de las proteínas específicas involucradas, ya que pueden actuar como marcadores de fertilidad, que en la industria permitiría evaluar el potencial reproductivo de los machos y su idoneidad para la criopreservación (Druart et al., 2019).

VI. CONCLUSIONES

1. Los parámetros de calidad seminal del semen fresco de alpaca no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) en la época de secano y lluvias.
2. La concentración de proteína total en el plasma seminal del semen de alpaca no mostró diferencias significativas ($p>0,05$) en la época de secano y lluvias.
3. El perfil electroforético unidimensional permitió establecer 13 bandas de proteínas de distintos pesos moleculares tanto en época de secano y lluvias, las cuales correspondieron a: 122,54 kDa; 82,17; kDa 73,48 kDa; 66,92 kDa; 59,71 kDa; 50,44 kDa; 42,27 kDa; 36,32 kDa; 29,61 kDa; 25,97 kDa; 14,71 kDa; 10,17 kDa y 6,28 kDa, de las cuales las bandas 29,61 kDa; 10,17 kDa y 6,28 kDa difieren significativamente ($p>0,05$) en la concentración relativa en ambas épocas.
4. Se estableció correlación negativa entre la banda de 73,48 kDa y la filancia; entre las bandas de 66,92 kDa y 29,61 kDa con la integridad de membrana; entre la banda de 36,32 kDa y la funcionalidad de membrana; y entre las bandas de 10,17 kDa y 6,28 kDa con la integridad acrosomal. Se estableció correlación positiva entre las bandas de 50,44 kDa y 10,17 kDa con la integridad acrosomal y la filancia, respectivamente; y entre la banda de 42,27 kDa con la movilidad.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios de la calidad seminal y caracterización proteica del semen fresco de alpaca en su hábitat natural durante el año, para evaluar el efecto de la alimentación *in situ* en el semen, la expresión de proteínas y su correlación con la calidad seminal durante todas las variaciones climáticas del año, así como también aumentar la población de estudio.
2. Realizar estudios avanzados de proteómica como electroforesis bidimensional, espectrometría de masas (MS/MS) y Western Blot para identificar marcadores proteicos de la calidad seminal en alpacas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, A., & Forcada. (2010). *Manejo reproductivo en ganado ovino*. Servet Editorial.
<https://elibro.net/es/ereader/ucasal/59398>
- Aisen, E. G., Huanca López, W., Pérez Durand, M. G., Torres Mamani, E., Villanueva Mori, J. C., Ousset, M. J., Medina, V. H., Pérez Guerra, U. H., & Huanca Mamani, T. (2021). Spermatozoa Obtained From Alpaca vas deferens. Effects of Seminal Plasma Added at Post-thawing. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611301>
- Akcay, E., Reilas, T., Andersson, M., & Katila, T. (2006). Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 53(9), 481-485.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2006.00882.x>
- Al-Bulushi, S., Manjunatha, B. M., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2019). Reproductive seasonality of male dromedary camels. *Animal Reproduction Science*, 202, 10-20.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.013>
- Barajas, D. (2013). *Expresión Proteómica del Plasma Seminal del Toro Criollo San Martinero y su Relación con la Fertilidad y Desarrollo Embrionario in Vitro en Condiciones del Trópico Bajo Colombiano* [Universidad de Murcia].
<https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/36258/6/tesis%20Patricia%20Barajas.pdf>
- Baraja-Vasquez, G., Baldwin-Sevilla, C., Barbosa, O., & Sanchez-Rodríguez, S. (2005). The heat shock proteins 60, 70 and 90 participate in the adaptation of goats to the arid zones. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 6.
https://www.researchgate.net/publication/26447042_Las_proteinas_de_estres_calorico_Hsp60_70_y_90_participan_en_la_adaptacion_de_los_caprinos_a_las_zonas_aridas
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., & Manjunath, P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 71(4), 461-470.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20310>

- Bravo, P., Moscoso, R., Alarcon, V., & Ordoñez, C. (2002). Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Andrology*, 48(1), 65-72. <https://doi.org/10.1080/014850102753385224>
- Bravo, P., Skidmore, J. A., & Zhao, X. X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 173-193. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00158-5)
- Bustinza, A. V., Machaca Machaca, V., Cano, V., & Quispe, J. (2021). Evolución y desarrollo de las razas de Alpaca: Suri y Huacaya. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5), e19876. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19876>
- Cardozo, J. A., Fernández-Juan, M., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (2008). Identification of RSVP14 and RSVP20 components by two-dimensional electrophoresis and Western-blotting. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43(1), 15-21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00845.x>
- Carretero, M., Fumuso, F., Miragaya, M., & Giuliano, S. (2015). Evaluación del estado acrosomal en espermatozoides de llama. *SPERMOVA*, 5(2), 258-263. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.46>
- Carretero, M., Pigretti, C., Bertuzzi, M. L., & Fumuso, F. G. (2018). Test hipoosmótico combinado a la tinción de Coomassie blue en espermatozoides de llama. *SPERMOVA*, 8(2), 129-132. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.10>
- Chacur, M., Castillo, A. M. N., Godoy, G. B., Gandolfo, V. S., Machado Neto, N., Kronka, S., & Guaberto, E. M. L. (2011). Season influence on the seminal plasma proteins in tabapua breed (bos taurus indicus). *Archivos de Zootecnia*, 60, 301-304. <http://dx.doi.org/10.21071/az.v60i230.4680>
- Contreras, M., Olaguivel Flores, C. A., Palomino, C. Y. G., Carretero, M. I., Fumuso, F. G., & Arcce, I. M. L. (2024). Pregnancy and birth rate outcomes in alpacas (Vicugna pacos) inseminated with frozen semen using two commercial extenders. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 59(1), e14514. <https://doi.org/10.1111/rda.14514>
- Cueva, R. (2018). *Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de Vicugna pacos "alpaca" recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado. Ayacucho—2018*. [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2835>

- Delgado, J. (2019). *Evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en muestras frescas sin fijar (0 horas) y muestras fijadas en formaldehído (24 horas y 1 semana) mediante citometría de flujo*. [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/14580/Delgado_oj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Desnoyers, L., Théarien, I., & Manjunath, P. (1994). Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Molecular Reproduction and Development*, 37(4), 425-435.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080370409>
- Díaz, H. (2014). *Evaluación de características bioquímicas del plasma seminal de alpacas, fresco y postdescongelamiento*. [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/3771>
- Druart, X., & de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal Reproduction Science*, 194, 33-40.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.061>
- Druart, X., Rickard, J. P., Mactier, S., Kohnke, P. L., Kershaw-Young, C. M., Bathgate, R., Gibb, Z., Crossett, B., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Grupen, C. G., & de Graaf, S. P. (2013). Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 91, 13-22.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.029>
- Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., & de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology*, 137, 30-35.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.034>
- Ferré, L. B., Malik, G., Aller, J. F., Alberio, R. H., Fresno, C., & Kjelland, M. E. (2015). Llama (Lama glama) semen collection via thermo-electric artificial vagina: Effect of seasonality and collection interval on ejaculate characteristics. *Small Ruminant Research*, 133, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.08.016>
- Flores, N. (2018). *Criopreservación de Espermatozoides de Alpaca (Vicugna pacos) utilizando N, N Dimetilformamida al 4% y 7%*. Universidad de Buenos Aires.
- Fowler, M. E. (1998). *Medicine and surgery of South American camelids: Llama, alpaca, vicuña, guanaco* (Segunda).

- Fumuso, F., Carretero, M., Neild, D., Miragaya, M., & Giuliano, S. (2015, marzo 25). *Evaluación de la viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides de Llama (Lama glama). Resultados preliminares.*
- Fumuso, F., Giménez, M., Giuliano, S., Chaves, M., Carretero, M., & Neild, D. (2014). Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *SPERMOVA*, 4(1), 50-53.
- Garner, D. L., & Johnson, L. A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53(2), 276-284. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.2.276>
- Garnica, J., Achata, R., & Bravo, P. W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*, 32(1), 85-90. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z)
- Giuliano, S., Bisiau, C., Carretero, M., Arraztoa, C. C., & Neild, D. (2012). Use of Comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*, 14.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (Lama glama). *Animal Reproduction Science*, 104(2), 359-369. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.016>
- Gonzales, H. (2008). Obtención y Criopreservación de Espermatozoides de Alpacas. *Scientia*, 10, 223-234.
- Greube, A., Müller, K., Töpfer-Petersen, E., Herrmann, A., & Müller, P. (2004). Interaction of Fibronectin Type II Proteins with Membranes: The Stallion Seminal Plasma Protein SP-1/2. *Biochemistry*, 43(2), 464-472. <https://doi.org/10.1021/bi035647l>
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales* (Séptima). McGraw-Hill Interamericana. <https://www.scribd.com/doc/150197543/HAFEZ-REPRODUCCION-E-INSEMINACION-ARTIFICIAL-pdf>
- Hanzen, C., Cucho, H., Ampuero, E., Ordoñez, C., & Sumar, J. (2015). *Principios de la Reproducción de los Camélidos Sudamericanos*. (Primera). Revista Veterinaria Argentina. <https://www.veterinariargentina.com/revista/2015/01/principios-de-la-reproduccion-de-los-camelidos-sudamericanos/>

- Honda, A., Siruntawineti, J., & Baba, T. (2002). Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Human Reproduction Update*, 8(5), 405-412. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.5.405>
- Huanca, T. (1996). *Manual del Alpaquero* (Tercera). Instituto Nacional de Investigación Agraria - INIA. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/978/1/Huanca-manual_del_alpaquero.pdf
- Huanca, T., Mamani, R., Naveros, M., & Condori, N. (2011). VARIACIÓN INDIVIDUAL Y ESTACIONAL DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN LA ALPACA (Vicugna pacos). *SPERMOVA*, 1(1), 98-100.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219-228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H. F., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., & Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1485), 2575-2584. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1774>
- Kelly, V. C., Kuy, S., Palmer, D. J., Xu, Z., Davis, S. R., & Cooper, G. J. (2006). Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *PROTEOMICS*, 6(21), 5826-5833. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500830>
- Kershaw-Young, C. M., Druart, X., Vaughan, J., & Maxwell, W. M. C. (2012). β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reproduction, Fertility, and Development*, 24(8), 1093-1097. <https://doi.org/10.1071/RD12039>
- Kershaw-Young, C. M., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2012). Glycosaminoglycans in the accessory sex glands, testes and seminal plasma of alpaca and ram. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(2), 362-369. <https://doi.org/10.1071/RD11152>
- Kershaw-Young, C. M., & Maxwell, W. M. C. (2011). The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*, 76(7), 1197-1206. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.016>
- Kershaw-Young, C. M., & Maxwell, W. M. C. (2012). Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals*

= *Zuchthygiene*, 47 Suppl 4, 369-375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>

Kershaw-Young, C. M., Stuart, C., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2013). The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Animal Reproduction Science*, 138(3-4), 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.005>

Kumar, S., Sharma, V. K., Singh, S., Hariprasad, G. R., Mal, G., Srinivasan, A., & Yadav, S. (2013). Proteomic identification of camel seminal plasma: Purification of β -nerve growth factor. *Animal Reproduction Science*, 136(4), 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.11.001>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Leeuw, F. E. de, Colenbrander, B., Verkleij, A. J., Leeuw, F. E. d, Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Boar Semen Preservation II Proceedings of the Second International Conference on Boar Semen Preservation Held at Beltsville, Maryland, USA, August, 1990*, 95-104.

Levanti, M. B., Germanà, A., Carlos, F. de, Ciriaco, E., Vega, J. A., & Germanà, G. (2006). Effects of increased nerve growth factor plasma levels on the expression of TrkA and p75NTR in rat testicles. *Journal of Anatomy*, 208(3), 373. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00528.x>

Li, C., Sun, Y., Yi, K., Ma, Y., Sun, Y., Zhang, W., & Zhou, X. (2010). Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. *Theriogenology*, 74(9), 1615-1622. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.033>

Lima Verde, I., Nongbua, T., Karkehabadi, S., Johannisson, A., & Morrell, J. M. (2020). Effect of season on bovine seminal plasma proteins in Thailand. *Journal of Thermal Biology*, 90, 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102576>

Linares, E. (2020). *Evaluación de la temperatura sobre la integridad de la membrana plasmática del semen de alpaca criopreservados, Ayacucho 2019* [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/5184>

- MINAGRI. (2018). *Sumaq Alpaca, Situación de la Alpaca en el Perú* (p. 3) [Boletín]. Ministerio de Agricultura y Riego. <https://repositorio.midagri.gob.pe/bitstream/20.500.13036/268/1/bolet%C3%A9n-situaci%C3%B3n-de-la-alpaca-en-el-per%C3%BA-nov-2018.pdf>
- Molloy, M. P. (2000). Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins Using Immobilized pH Gradients. *Analytical Biochemistry*, 280(1), 1-10. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4514>
- Mortimer, S. T. (2000). CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology*, 21(4), 515-524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
- Morton, K., Vaughan, J., & Maxwell, C. (2008). *Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas*. Rural Industries Research and Development Corporation. <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/08-057.pdf>
- Muiño, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas* [Universidad de Santiago de Compostela]. <http://hdl.handle.net/10347/2406>
- Nauc, V., & Manjunath, P. (2000). Radioimmunoassays for Bull Seminal Plasma Proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and Their Quantification in Seminal Plasma and Sperm1. *Biology of Reproduction*, 63(4), 1058-1066. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.4.1058>
- Orellana, H. R. (2024). *Maduración nuclear e integridad del ADN espermático de “alpaca” en semen fresco y congelado*. INIA - Ayacucho, 2019 [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. <https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/123456789/6743>
- Pini, T., Leahy, T., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Combes-Soia, L., Harichaux, G., Rickard, J. P., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2016). Proteomic Investigation of Ram Spermatozoa and the Proteins Conferred by Seminal Plasma. *Journal of Proteome Research*, 15(10), 3700-3711. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00530>
- Ramesha, K. P., Mol, P., Kannegundla, U., Thota, L. N., Gopalakrishnan, L., Rana, E., Azharuddin, N., Mangalaparthi, K. K., Kumar, M., Dey, G., Patil, A., Saravanan, K., Behera, S. K., Jeyakumar, S., Kumaresan, A., Kataktalware, M. A., & Prasad, T. S. K. (2020). Deep Proteome Profiling of Semen of Indian Indigenous Malnad Gidda

- (*Bos indicus*) Cattle. *Journal of Proteome Research*, 19(8), 3364-3376.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00237>
- Ratto, M. H., Huanca, W., & Adams, G. P. (2010). Ovulation-inducing factor: A protein component of llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 8, 44. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-44>
- Rickard, J. P., Leahy, T., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Lynch, G. W., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2015). The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 126, 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.017>
- Rodríguez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2011). Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play? *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(s1), 11-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x>
- Sarsaifi, K., Haron, A. W., Vejayan, J., Yusoff, R., Hani, H., Omar, M. A., Hong, L. W., Yimer, N., Ju, T. Y., & Othman, A.-M. (2015). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology*, 84(6), 956-968. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.035>
- Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P. L., Dacheux, J. L., Guérin, Y., Gatti, J. L., de Graaf, S. P., & Druart, X. (2014). Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *Journal of Proteomics*, 109, 245-260. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.007>
- Souto, P. L., Carmouy, L. S. T., Santos, C., Martins, E., Martins, V., Hatamoto-Zervoudakis, L. K., Murad, A. M., Mehta, A., McManus, C., & Ramos, A. F. (2021). Seasonal differences in seminal plasma proteins from two bovine breeds adapted to a subtropical climate. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1), 61. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02536-8>
- Sumar, J. (1983). *Studies on reproductive pathology in alpacas* [SLU]. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Studies+on+reproductive+pathology+in+alpacas&author=Sumar%2C+J.+%28Sveriges+Lantbruksuniv.%2C+Uppsala.+Inst.+foer+Obstetrik+och+Gynekologi%29&publication_year=1983
- Troedsson, M. H. T., Desvouses, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P. T., Macpherson, M. L., Pozor, M., & Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination.

Animal Reproduction Science, 89(1-4), 171-186.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.005>

Trujillo, J. (2019). *Estudio histológico del espermatozoide de alpaca y su correlación con las características microscópicas de calidad seminal en el fundo, Cerro de Pasco, 2019*. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.

Vaughan, J., Galloway, D., & Hopkins, D. (2003). *Artificial insemination in alpacas (Lama pacos)* (Primera). Rural Industries Research and Development Corporation.
https://scholar.google.com.pe/scholar_url?url=https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/03-104.pdf&hl=es&sa=X&ei=BvoEY57YD6mXy9YPsMyVuAs&scisig=AAGBfm3hTV8xL1eEsgmFNkXk5UhlvYNGzg&oi=scholar

Villanueva, J. C., Huanca, W. F., Hilari, F., Uchuari, M., Rodríguez, F., & Huanca, W. (2018). Efecto de la estación sobre las características seminales de alpacas (Vicugna pacos) criadas a nivel del mar. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2), 559-564. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14483>

ANEXOS

Anexo 1. Registro total de datos meteorológicos obtenidos de la Red Hidrometeorológica – OPEMAN de la Estación INIA - CANAAN a 2736 msnm, 13°09'48" S y 74°12'20" W, en la época de secano (agosto y septiembre) y lluvia (noviembre y diciembre). Ayacucho, 2023

Dia	Precipitación				Temperatura máxima				Temperatura mínima				Humedad relativa			
	Ago	Set	Nov	Dic	Ago	Set	Nov	Dic	Ago	Set	Nov	Dic	Ago	Set	Nov	Dic
1	0,00	0,00	0,00	3,80	24,80	25,80	27,80	23,40	6,40	8,40	10,00	11,80	75	82	66	91
2	0,00	0,00	0,00	0,00	26,00	25,40	29,80	27,00	5,80	9,40	9,00	12,00	75	80	83	86
3	0,00	0,00	0,00	7,80	25,60	25,40	28,40	28,00	6,80	8,60	11,60	12,80	74	81	77	77
4	0,00	0,00	0,00	0,00	24,40	26,40	23,00	27,80	7,60	9,40	13,60	9,80	80	79	80	82
5	0,00	0,00	2,30	0,00	23,20	23,20	25,80	27,20	4,40	11,40	14,00	10,00	81	80	82	81
6	0,00	7,50	0,40	0,00	24,80	25,80	26,80	27,40	7,80	10,60	12,80	8,80	79	78	78	79
7	0,00	0,00	0,00	0,00	26,40	25,40	26,60	26,00	4,40	8,20	11,20	10,80	77	77	76	81
8	0,00	0,00	9,00	3,10	25,60	26,20	25,40	27,20	9,40	8,60	14,20	12,00	78	74	79	80
9	0,00	0,00	4,60	0,00	24,80	26,00	19,00	20,00	9,40	8,40	11,00	11,80	80	73	91	91
10	0,00	0,00	0,00	0,00	27,40	26,20	25,20	26,20	9,00	9,40	9,60	11,00	77	76	84	86
11	0,00	0,00	0,00	2,80	24,60	26,60	27,00	28,60	9,00	10,00	13,20	10,80	78	74	84	85
12	0,00	0,00	0,00	9,60	25,20	25,80	26,80	25,20	7,40	9,60	11,60	11,40	78	74	84	84
13	0,00	0,00	0,20	12,70	24,80	26,80	28,20	25,40	8,20	9,80	13,00	11,00	79	73	78	82
14	0,00	0,00	0,00	0,00	25,60	26,60	26,00	25,60	7,80	9,00	12,20	12,00	80	74	76	83
15	0,00	0,00	2,50	3,10	25,80	25,80	28,20	26,20	7,60	11,00	10,60	12,20	77	73	75	83
16	0,00	0,00	0,00	7,60	27,40	27,40	26,20	24,60	7,80	11,00	12,80	13,20	80	67	76	90
17	0,00	0,00	0,90	0,40	28,60	24,20	29,20	26,00	7,40	13,00	10,60	12,40	74	76	78	88
18	0,00	2,50	0,00	9,90	30,00	23,60	29,80	26,20	7,80	11,00	12,00	12,20	68	87	78	80
19	0,00	0,80	0,00	0,00	28,60	25,40	27,60	27,20	6,60	9,80	14,20	13,20	73	78	76	84
20	0,00	0,00	0,00	0,00	28,00	25,60	29,40	23,40	8,20	11,80	13,20	13,20	73	82	74	88
21	0,00	0,00	1,50	0,00	27,20	23,40	28,60	25,60	8,00	12,00	11,40	12,80	75	79	77	85
22	0,00	0,00	0,00	0,00	27,20	27,20	29,80	25,00	8,00	8,80	12,20	10,40	74	78	74	88
23	0,00	0,00	4,50	1,20	27,40	26,40	26,60	28,20	8,00	9,60	10,80	9,80	74	75	71	81
24	0,00	1,90	4,00	2,30	28,00	25,60	25,00	24,60	9,40	12,20	11,00	12,20	73	78	85	85
25	0,00	0,00	2,60	0,00	28,20	27,20	17,00	26,80	9,20	9,20	9,80	12,40	73	76	97	80
26	0,00	0,00	0,00	7,20	27,00	29,00	25,80	19,80	9,80	11,60	12,40	10,60	76	76	85	90
27	0,00	0,00	2,50	0,90	26,20	27,60	25,80	23,60	9,00	12,20	13,80	11,00	78	76	87	88
28	0,00	4,20	0,00	10,10	27,20	29,00	26,80	26,60	11,80	14,80	12,60	12,40	76	79	82	81
29	0,00	0,00	0,00	1,70	27,80	25,40	23,60	26,80	10,20	10,80	10,60	12,60	77	79	83	73
30	0,00	0,00	7,80	7,30	27,80	24,80	25,60	23,80	10,00	11,40	13,20	11,40	74	82	80	90
31	1,20			1,50	26,60		22,40		9,60		12,60		78			92

Anexo 2. Registro total de datos de calidad seminal de semen fresco de alpaca en la época de secano (agosto y septiembre). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación INIA - CANAAN. Ayacucho, 2023

N° alpaca	ID alpaca	Fecha	Color	Vol. (mL)	Espuma (cm)	Filancia (cm)	Conc. (Mill/mL)	Motilidad (%)	Integridad membrana (%)	Funcional membrana (%)	Integridad acrosoma (%)
1	17026	14/8/2023	Blanco lechoso	1	2,5	3	254	80	56,38	44,6	92
1	17026	23/8/2023	Blanco lechoso	0,5	6	2,5	164	80	51,27	54,02	89,3
1	17026	28/8/2023	Blanco cristalino	3	5	3	119	95	57,05	49,34	96,92
2	7012	21/8/2023	Blanco lechoso	1	2	0,5	146	77,8	55,12	54,97	88,5
2	7012	24/8/2023	Blanco lechoso	1,1	1,5	0,2	191	67	51,37	48,13	93,27
2	7012	5/9/2023	Blanco lechoso	1,5	0,4	0,5	151	57,9	52,25	44,76	91,51
3	9184	23/8/2023	Blanco lechoso	1,5	1	0,2	164	53,8	52,4	70,98	91
3	9184	1/9/2023	Blanco cristalino	1,2	1	0,5	175	56,8	43,87	89,4	90,86
3	9184	8/9/2023	Blanco cristalino	1,5	0,2	0,3	187	50,3	49,26	77,93	98,51
4	50E	14/8/2023	Blanco lechoso	0,7	5	0,5	121	91,2	51,39	96,53	90
4	50E	28/8/2023	Blanco lechoso	2	10	0,5	81	74,8	55,86	95,63	94,09
4	50E	31/8/2023	Blanco lechoso	2	5	0,3	130	84,9	56,2	90,1	96,04
5	9210	15/8/2023	Blanco lechoso	1	5	0,5	96	58,9	54,51	46,31	94,52
5	9210	31/8/2023	Blanco lechoso	1	5	0,5	88	64,1	45,66	57,62	91,94
5	9210	4/9/2023	Blanco lechoso	1,5	2,4	0	132	80,7	57,73	48,84	95,81
6	2048	20/7/2023	Blanco lechoso	1	0,5	0,7	187	59,1	48,04	52,5	94,5
6	2048	25/7/2023	Blanco lechoso	1,2	5	0,5	192	61,6	50,32	59,4	95
6	2048	9/8/2023	Blanco lechoso	1	1	0,5	118	57,8	56,78	47,26	95
7	204	21/8/2023	Blanco cristalino	2,7	2	4,5	55	48,2	46,95	74	89,52
7	204	4/9/2023	Blanco cristalino	4,3	2	2	67	51,7	45,75	77,67	91,43
7	204	5/9/2023	Blanco cristalino	2	1,5	2	40	60	57,71	61,29	94
8	1997	28/8/2023	Blanco lechoso	1,6	1	2	50	58,5	58,74	61	88,5
8	1997	5/9/2023	Blanco cristalino	3,5	0	1	65	52,6	55,62	62,62	89,2
8	1997	8/9/2023	Blanco cristalino	1,2	0,5	2	49	54,1	65,61	77,63	99,12

Anexo 3. Registro total de datos de calidad seminal de semen fresco de alpaca en la época de lluvia (noviembre y diciembre). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación INIA - CANAAN. Ayacucho, 2023

N° alpaca	ID alpaca	Fecha	Color	Vol. (mL)	Espuma (cm)	Filancia (cm)	Conc. (Mill/mL)	Motilidad (%)	Integridad membrana (%)	Funcional membrana (%)	Integridad acrosoma (%)
1	17026	31/10/2023	Blanco lechoso	1,8	5	1	150	59,9	56,01	41,25	94,59
1	17026	3/11/2023	Blanco lechoso	2	5	2	163	64,1	52,61	34,35	97,04
1	17026	6/11/2023	Blanco lechoso	2	2	2	180	58,2	51,48	46,12	94,26
2	7012	25/9/2023	Blanco lechoso	1	0,5	0	163	97,8	40,41	75,94	99,04
2	7012	24/10/2023	Blanco lechoso	1,5	0,3	0	176	95,1	54,08	81,06	99,55
2	7012	27/10/2023	Blanco lechoso	1,8	0,3	0	163	80,1	52,41	65,79	94,42
3	9184	3/11/2023	Blanco lechoso	0,6	2	0	132	81	48,7	83,77	97,32
3	9184	9/11/2023	Blanco lechoso	0,2	0,3	0	119	97,3	56,8	73,24	96,66
3	9184	27/11/2023	Blanco lechoso	0,3	0	0,5	196	97,3	55,93	90,64	91,63
4	50E	16/10/2023	Blanco lechoso	0,7	4	0,2	199	56,6	51,54	90,47	96,19
4	50E	25/10/2023	Blanco lechoso	1,5	5	0	108	52,5	54,45	95,04	100
4	50E	3/11/2023	Blanco lechoso	0,7	3	0	181	82,8	53,59	95,63	99
5	9210	31/10/2023	Blanco cristalino	0,6	4	0	95	50,1	39,01	56,72	89,55
5	9210	22/11/2023	Blanco lechoso	1	3	0	114	57,2	55,2	62,07	95,57
5	9210	24/11/2023	Blanco lechoso	1,2	4	0,5	71	54,4	45,73	62,07	95,57
6	2048	25/9/2023	Blanco lechoso	1,8	0,5	0	178	61,4	55,56	34,5	94,65
6	2048	6/10/2023	Blanco cristalino	0,8	0,4	0,2	117	61,5	52,94	32,71	92
6	2048	23/10/2023	Blanco lechoso	1,5	0,3	0	125	55,1	49,19	36,87	97,16
7	204	2/10/2023	Blanco cristalino	1,2	0,3	2	46	76,4	47,35	55,78	88,4
7	204	13/10/2023	Blanco cristalino	2,5	1,7	3	58	74,1	57,35	45,78	89,15
7	204	16/10/2023	Blanco cristalino	1,8	1	3	59	63,6	61,61	50,92	87,96
8	1997	10/10/2023	Blanco cristalino	0,6	0	3	150	55,2	46,2	51,24	97,51
8	1997	24/10/2023	Blanco cristalino	4	2	3	66	49,6	42,58	39,22	84,31
8	1997	8/11/2023	Blanco cristalino	1,5	0,2	1,5	102	79,5	55,28	35,52	95,05

Anexo 4. Datos de concentración total de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en el plasma seminal de alpaca ($r=3$). Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Biología - UNSCH. Ayacucho, 202

N° alpaca	ID alpaca	Época de secano				Época de lluvia			
		Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	MEDIA $\pm$ DS
1	17026	8,49	14,73	10,82	$11,35 \pm 1,82$	10,19	7,88	12,37	$10,15 \pm 1,3$
2	7012	6,08	5,65	4,83	$5,52 \pm 0,37$	10,76	9,22	17,56	$12,51 \pm 2,56$
3	9184	7,24	10,88	10,04	$9,39 \pm 1,10$	11,23	14,58	11,79	$12,53 \pm 1,04$
4	50E	15,89	15,14	11,23	$14,09 \pm 1,44$	9,70	18,28	23,08	$17,02 \pm 3,91$
5	9210	19,02	17,12	19,59	$18,58 \pm 0,75$	10,78	11,60	20,80	$14,39 \pm 3,21$
6	2048	8,53	13,92	11,13	$11,19 \pm 1,56$	13,98	19,53	14,57	$16,03 \pm 1,76$
7	204	16,44	16,63	12,90	$15,32 \pm 1,21$	14,54	18,98	15,00	$16,17 \pm 1,41$
8	1997	9,62	10,85	14,54	$11,67 \pm 1,48$	11,56	12,59	14,16	$12,77 \pm 0,76$

Anexo 5. Datos de los pesos moleculares (kDa) de las bandas identificadas en los 8 machos evaluados en la época de secano (r=3).
Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Biología - UNSCH. Ayacucho, 2023

N° Banda	N° alpaca								Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	17026	7012	9184	50E	9210	2048	204	1997	
1				123,81		119,12	122,34	118,07	120,84
2	84,97	82,95				79,66			82,53
3	75,95	73,22	73,20	73,38	74,20	70,88	73,67	75,86	73,79
4	67,71	67,09	66,14	66,12	66,16	66,85	67,69	68,67	67,05
5	60,74	59,37	59,14	59,02	59,67	59,81	59,90	60,85	59,81
6	51,47		49,31		49,70		50,67		50,29
7		42,85	41,88		42,99				42,57
8	37,18		36,17	35,97	35,50		36,70	36,97	36,41
9	30,38	29,75	29,65	29,30	29,06	29,75	30,23	31,07	29,90
10				25,95	26,22	25,42		27,44	26,26
11	15,07	15,19	14,91	14,71	14,74	14,93		14,97	14,93
12	10,97	11,74	10,51	9,72	9,86	10,83	10,45	10,67	10,59
13	6,37	6,40	6,37	6,27	6,20	6,22	6,20	6,28	6,29
Σ Bandas	10	9	10	10	11	10	9	10	

Anexo 6. Datos de los pesos moleculares (kDa) de las bandas identificadas en los 8 machos evaluados en la época de lluvia (r=3).
Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Biología - UNSCH. Ayacucho, 2023

N° Banda	N° alpaca								Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	17026	7012	9184	50E	9210	2048	204	1997	
B1		124,22		122,88		123,01	126,51	122,87	123,90
B2	80,99	82,64				81,83			81,82
B3	73,57	74,32	72,30	72,18	73,26	71,70	72,91	75,11	73,17
B4	67,36	66,66	65,86	65,78	65,64	66,54	67,30	69,14	66,78
B5	59,93	59,06	58,83	59,04	59,42	59,29	59,96	61,34	59,61
B6	51,46		48,73		50,12		50,33	52,17	50,56
B7		42,15	41,39		42,37	42,23			42,03
B8	36,77	36,02	36,25	35,78	35,70	35,49	36,98	36,97	36,24
B9	29,91	28,82	29,46	29,08	28,94	28,83	29,73	29,84	29,32
B10			25,55	25,45	25,70	25,01		27,03	25,75
B11	14,27	14,81	14,44	14,24	14,41	14,38		14,91	14,50
B12	9,96	9,92	9,34	9,29	9,58	9,52	9,95	10,35	9,74
B13	6,22	6,65	6,20	6,20	6,20	6,20	6,20	6,22	6,26
∑ Bandas	10	11	11	10	11	12	9	11	

Anexo 7. Correlación de Person (r) de las bandas de proteínas identificadas y los parámetros de calidad de semen fresco de alpaca en la época de secano, en el programa SPSS. Ayacucho, 2023

N° Banda		Filancia	Movilidad	Integridad membrana	Funcional membrana	Integridad acrosoma
1	r	0,674	-0,845	-0,571	-0,715	-0,198
	Sig.	0,326	0,155	0,429	0,285	0,802
	N	4	4	4	4	4
2	r	-0,982	-0,842	-0,804	0,258	-0,186
	Sig.	0,123	0,363	0,405	0,834	0,881
	N	3	3	3	3	3
3	r	-0,730*	-0,372	-0,433	-0,346	0,121
	Sig.	0,040	0,364	0,284	0,401	0,775
	N	8	8	8	8	8
4	r	-0,311	-0,002	-0,761*	-0,172	-0,174
	Sig.	0,453	0,997	0,028	0,683	0,680
	N	8	8	8	8	8
5	r	-0,224	-0,337	-0,377	-0,324	-0,582
	Sig.	0,593	0,415	0,357	0,434	0,131
	N	8	8	8	8	8
6	r	0,277	-0,808	-0,761	0,835	-0,713
	Sig.	0,723	0,192	0,239	0,165	0,287
	N	4	4	4	4	4
7	r	0,927	0,119	0,195	-0,186	-0,983
	Sig.	0,245	0,924	0,875	0,881	0,117
	N	3	3	3	3	3
8	r	0,245	0,007	0,083	-0,823*	0,056
	Sig.	0,639	0,990	0,876	0,044	0,916
	N	6	6	6	6	6
9	r	-0,478	0,032	-0,690*	-0,430	0,162
	Sig.	0,231	0,939	0,050	0,288	0,702
	N	8	8	8	8	8
10	r	-0,074	-0,338	-0,399	-0,265	0,588
	Sig.	0,926	0,662	0,601	0,735	0,412
	N	4	4	4	4	4
11	r	0,243	0,403	0,447	0,409	0,507
	Sig.	0,600	0,371	0,315	0,363	0,245
	N	7	7	7	7	7
12	r	0,591	-0,399	-0,131	-0,004	-0,854**
	Sig.	0,123	0,328	0,758	0,992	0,007
	N	8	8	8	8	8
13	r	0,548	-0,317	-0,340	0,169	0,196
	Sig.	0,160	0,444	0,410	0,689	0,641
	N	8	8	8	8	8

*Correlación significativa ($p<0,05$); **Correlación significativa ($p<0,01$)

Anexo 8. Correlación de Person (r) de las bandas de proteínas identificadas y los parámetros de calidad de semen fresco de alpaca en la época de secano, en el programa SPSS. Ayacucho, 2023

N° Banda		Filancia	Movilidad	Integridad membrana	Funcional membrana	Integridad acrosoma
1	r	0,360	-0,252	0,807	-0,612	-0,736
	Sig.	0,552	0,683	0,099	0,273	0,156
	N	5	5	5	5	5
2	r	0,455	0,546	-0,356	0,626	0,687
	Sig.	0,699	0,633	0,768	0,570	0,518
	N	3	3	3	3	3
3	r	-0,431	-0,273	-0,190	0,145	0,579
	Sig.	0,287	0,513	0,652	0,732	0,133
	N	8	8	8	8	8
4	r	-0,393	0,518	-0,086	0,262	0,287
	Sig.	0,335	0,189	0,840	0,531	0,491
	N	8	8	8	8	8
5	r	-0,211	0,333	-0,236	0,210	0,120
	Sig.	0,616	0,420	0,574	0,618	0,778
	N	8	8	8	8	8
6	r	0,291	0,707	0,961**	0,240	-0,386
	Sig.	0,635	0,182	0,009	0,697	0,522
	N	5	5	5	5	5
7	r	-0,135	0,987*	0,475	0,821	0,684
	Sig.	0,865	0,013	0,525	0,179	0,316
	N	4	4	4	4	4
8	r	-0,158	0,452	0,173	0,448	-0,001
	Sig.	0,709	0,261	0,682	0,266	0,999
	N	8	8	8	8	8
9	r	-0,275	0,248	-0,170	0,487	-0,033
	Sig.	0,510	0,553	0,687	0,220	0,939
	N	8	8	8	8	8
10	r	0,019	-0,843	-0,401	-0,055	0,277
	Sig.	0,976	0,073	0,504	0,930	0,652
	N	5	5	5	5	5
11	r	-0,073	0,024	-0,133	0,252	-0,034
	Sig.	0,876	0,960	0,776	0,585	0,942
	N	7	7	7	7	7
12	r	0,851**	-0,056	0,485	-0,427	-0,716*
	Sig.	0,007	0,895	0,223	0,291	0,046
	N	8	8	8	8	8
13	r	0,586	-0,331	0,612	-0,490	-0,789*
	Sig.	0,127	0,423	0,107	0,218	0,020
	N	8	8	8	8	8

*Correlación significativa ($p < 0,05$); **Correlación significativa ($p < 0,01$)

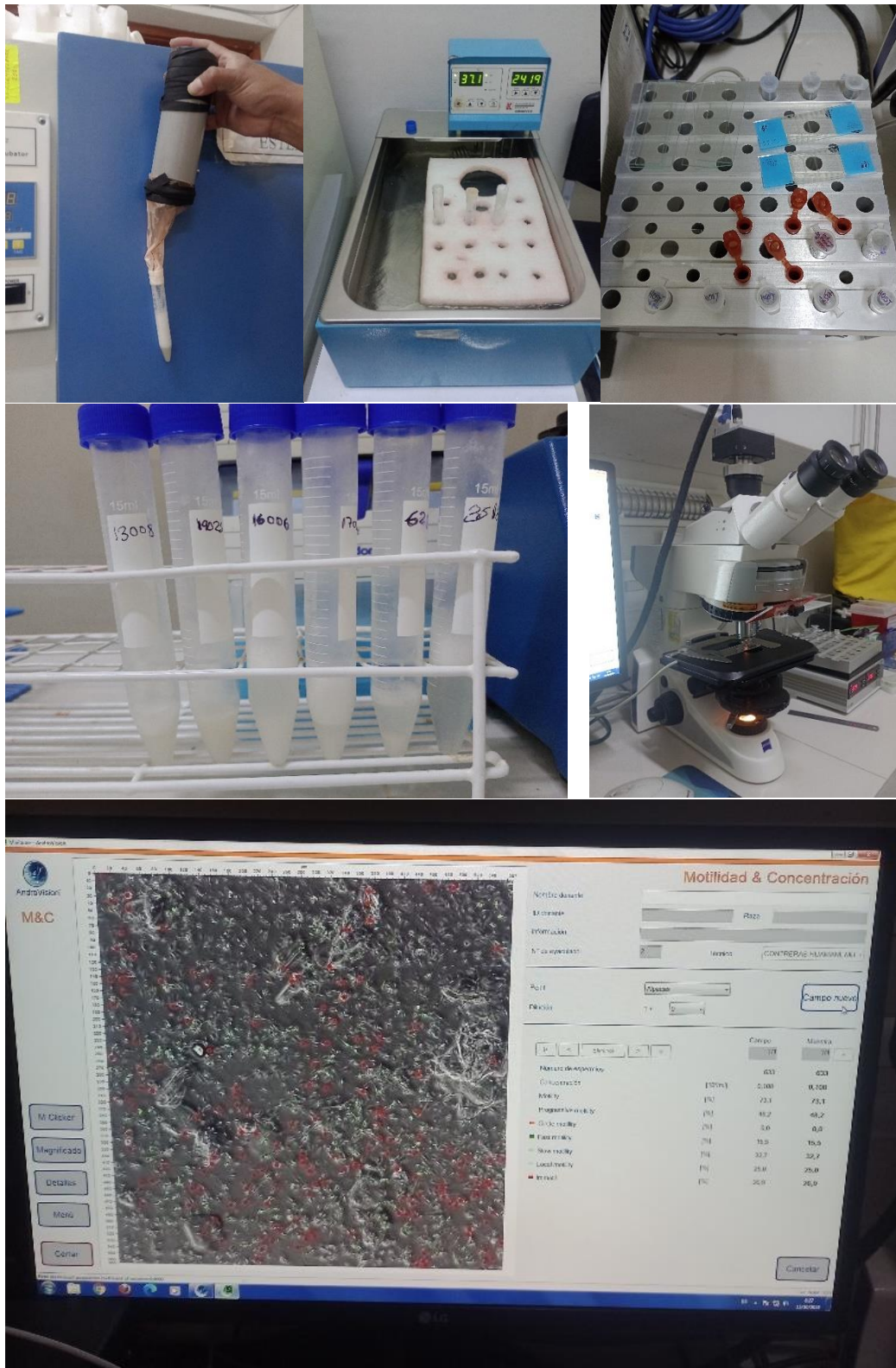
Anexo 9. Entrenamiento de alpacas al montado del maniquí y la vagina artificial.
Chicllarazo, Cangallo, Ayacucho 2023.



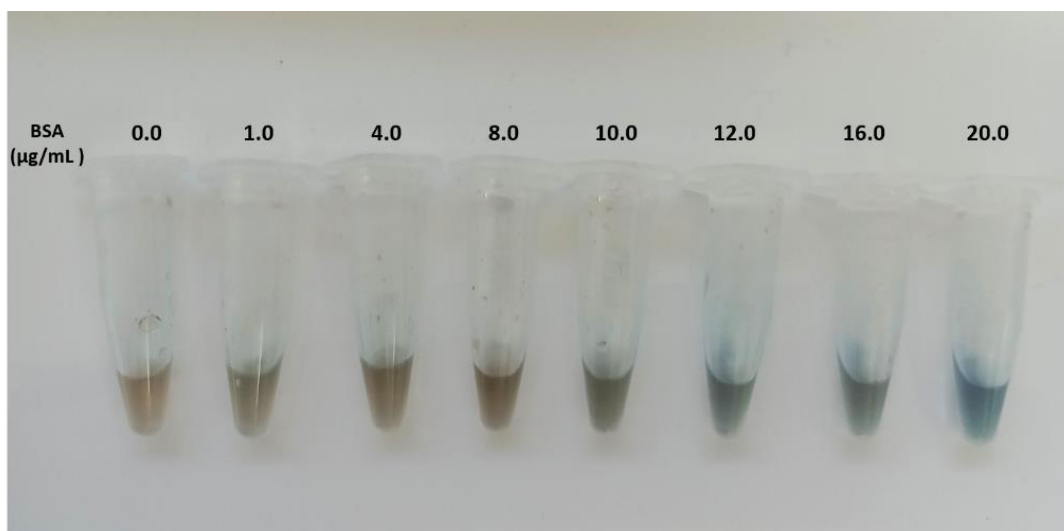
Anexo 10. Armado de vagina artificial y recolección de semen de alpaca. INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.



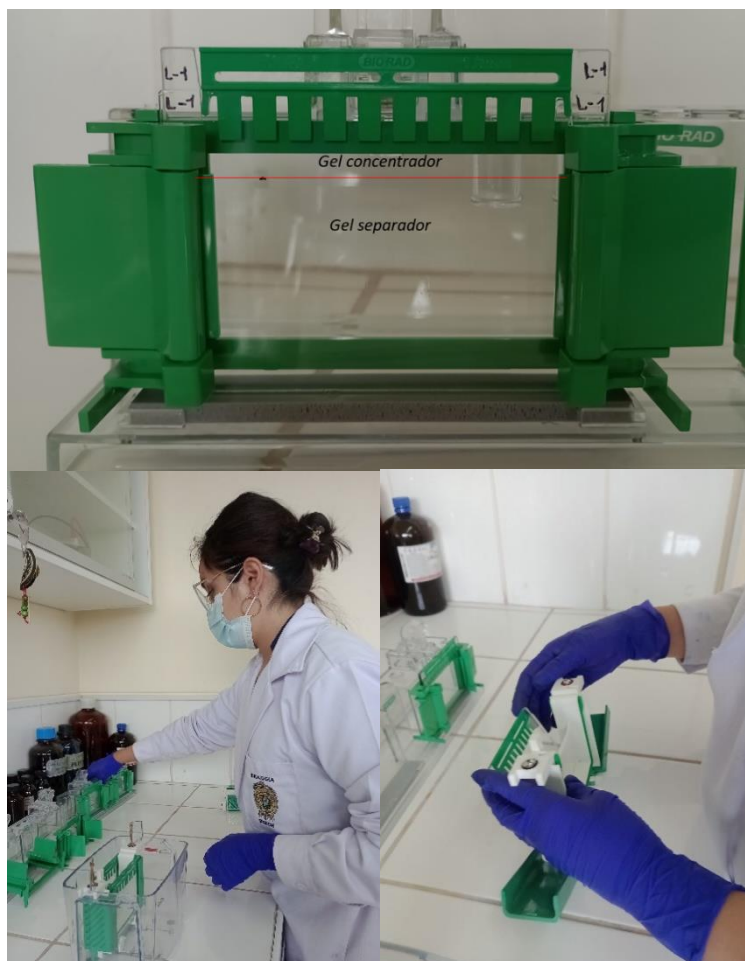
Anexo 11. Recepción de muestra seminal y análisis de calidad. INIA-CANAAN, Ayacucho 2023.



Anexo 12. Preparación de curva de calibración con albúmina y cuantificación de proteína total en el espectrofotómetro. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.



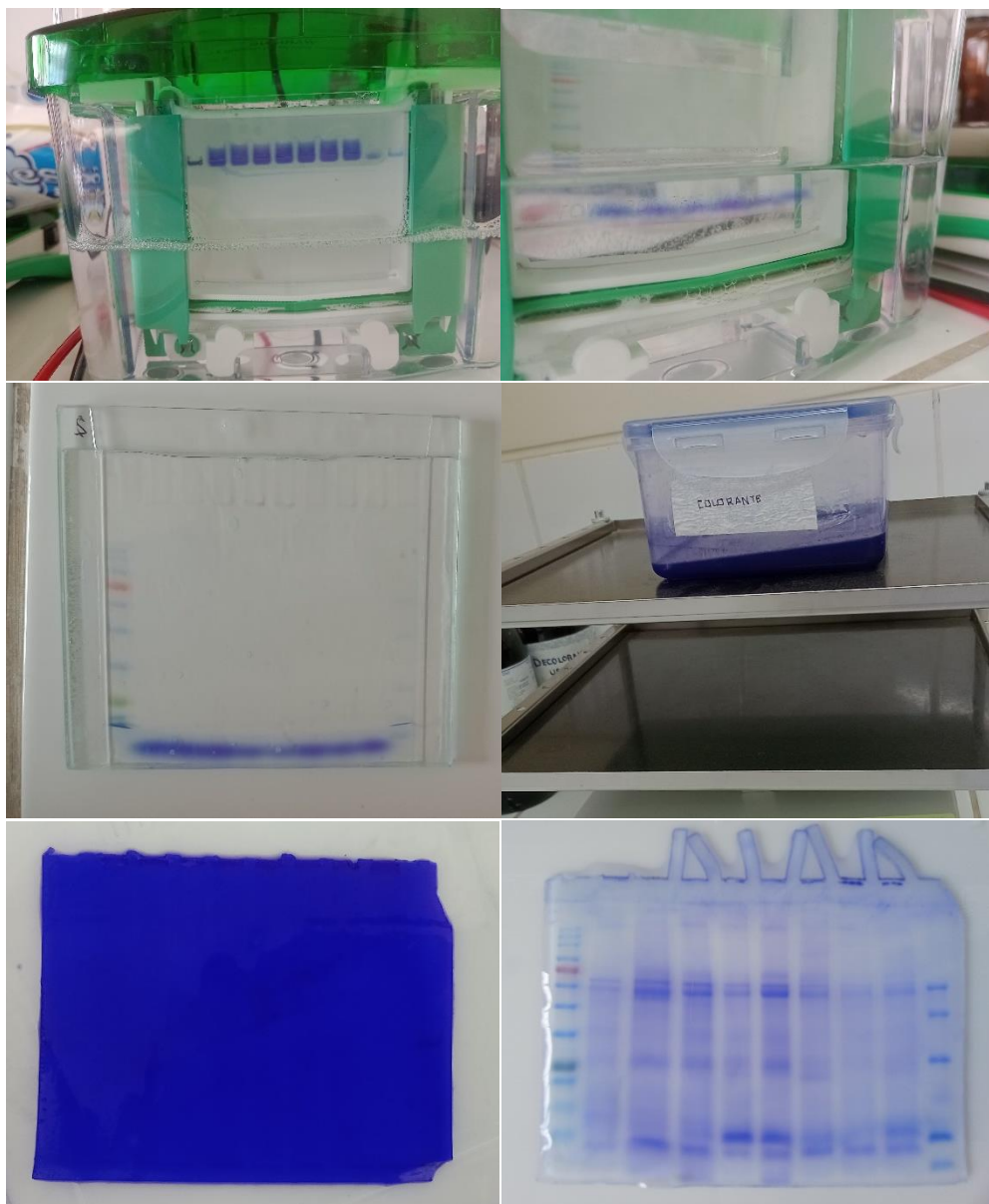
Anexo 13. Preparación de geles para electroforesis SDS-PAGE-1D y cargado de muestras. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.



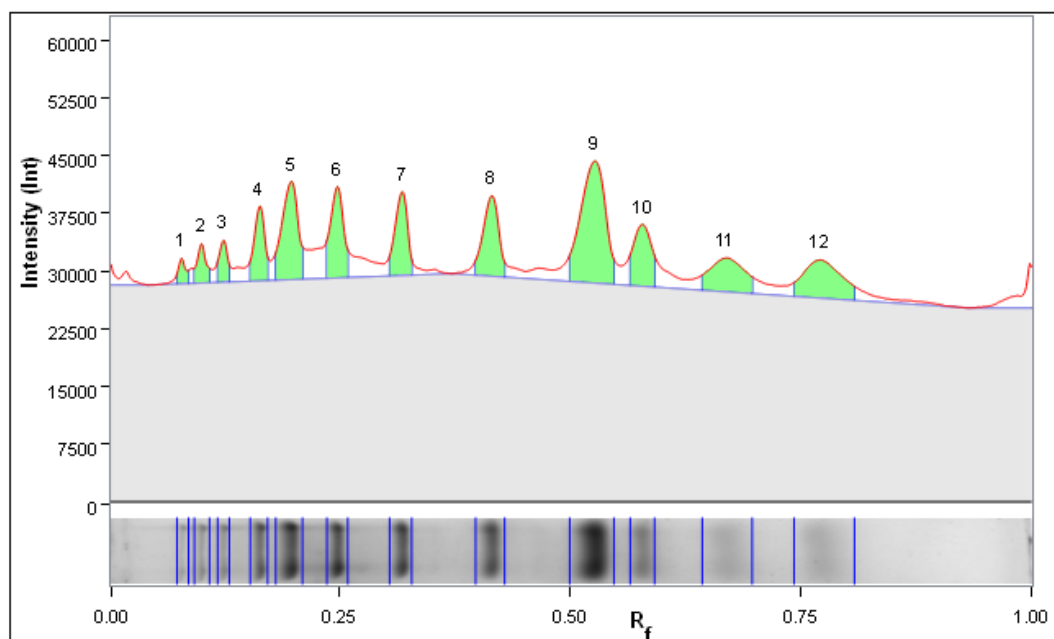
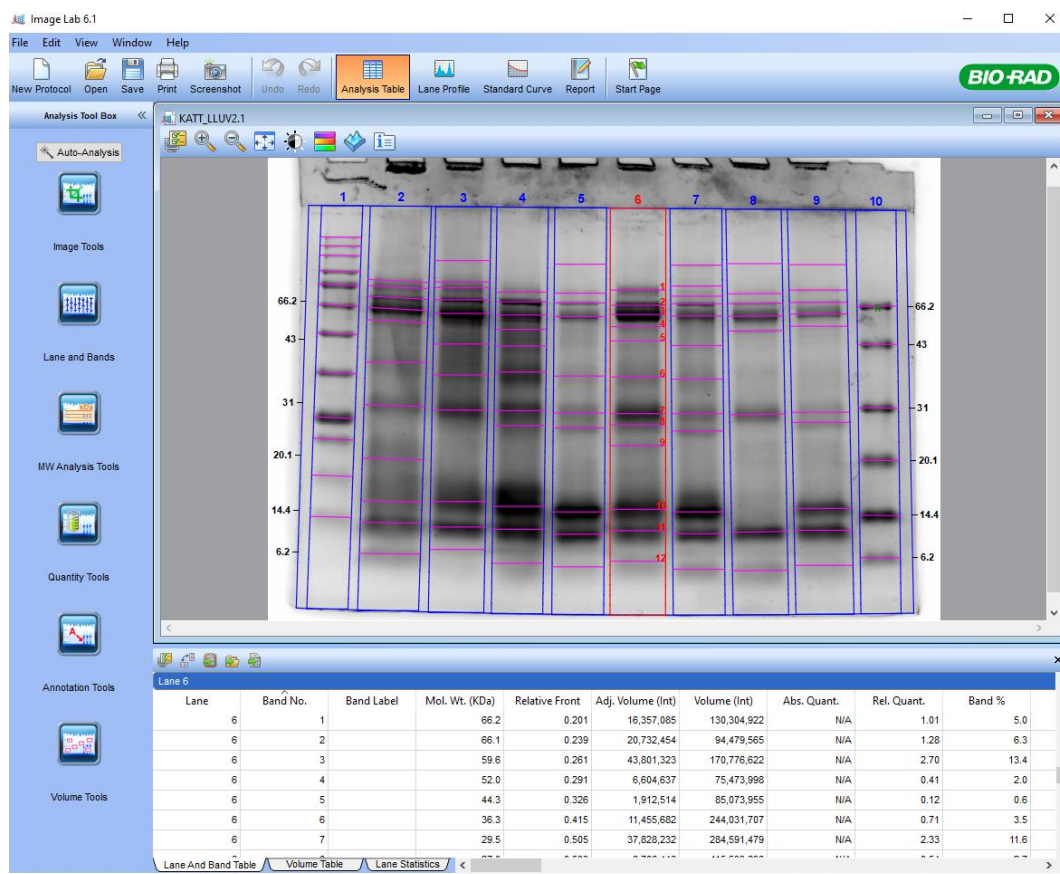
Anexo 14. Preparación de muestras para electroforesis SDS-PAGE-1D. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.



Anexo 15. Corrida de electroforesis SDS-PAGE-1D, coloración y decoloración de geles. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.



Anexo 16. Análisis de geles de electroforesis SDS-PAGE-1D con el programa Image Lab 6.1. Laboratorio de Biotecnología, UNSCH, Ayacucho 2023.



Anexo 17. Equipo de tesis y asesores del proyecto. Ayacucho 2023.



Anexo 18. Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Las épocas de secano y de lluvia influyen en la composición proteica del plasma seminal de alpaca y relacionarlo con los parámetros de la calidad seminal?	GENERAL Caracterizar el perfil electroforético de proteínas del plasma seminal de alpaca en dos épocas del año y relacionarlo con los parámetros de calidad seminal. ESPECÍFICOS 1. Evaluar los parámetros de calidad seminal (viscosidad, motilidad, vitalidad, funcionalidad de la membrana e integridad del acrosoma) del semen fresco de alpaca en época de lluvia y secano. 2. Determinar la concentración total de proteínas del plasma seminal de alpaca en época de lluvia y secano. 3. Realizar el perfil electroforético de proteínas del plasma seminal de alpaca en época de lluvia y secano.	1. Antecedentes 2. Descripción de variables: - Proteínas del plasma seminal. - Influencia de la estacionalidad en proteínas del plasma seminal. - Parámetros para evaluar la calidad seminal.	Los parámetros de calidad seminal y las proteínas del plasma seminal en la época de secano y lluvia serán diferentes.	VARIABLES INDEPENDIENTES - Épocas del año Indicadores: - Época de lluvia - Época de secano VARIABLES DEPENDIENTES 1. Parámetros de calidad seminal - Indicadores - Concentración ($10^6/\text{ml}$) - Motilidad (%) - Filancia (cm) - Viabilidad (%) - Funcionalidad de la membrana (%) - Integridad del acrosoma (%) 2. Proteínas del plasma seminal - Indicadores - Número de proteínas - Pesos moleculares (KDa) - Concentración relativa.	1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Básica 2. TIPO DE INVESTIGACIÓN Descriptiva, cuantitativa 3. POBLACIÓN Alpacas machos en edad reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del INIA, Ayacucho. 4. MUESTRA 10 alpacas machos en edad reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del INIA, Ayacucho. 5. TÉCNICA Prueba de viscosidad por filancia. Motilidad progresiva y total con el programa CASA Prueba de vitalidad con Eosina-Nigrosina Prueba HOST para funcionalidad de membrana. Prueba con Coomassie Blue para Integridad del acrosoma. Método de Bradford Electroforesis Unidimensional 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Los resultados serán evaluados con la prueba estadística de Prueba t para 2 muestras relacionadas y correlación de Pearson con el programa SPSS.



UNSCH

FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Kattery Rossabel CORDERO RUA

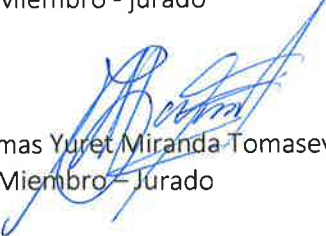
RESOLUCIÓN DECANAL N° 559-2024-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día miércoles once de diciembre del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín Tenorio Bautista, al mismo tiempo actuando como (miembro – jurado), el Dr. Gilmar Peña Rojas (miembro – jurado), Blgo. Tomas Yuret Miranda Tomasevich (miembro – jurado), Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua (miembro – asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel Moscoso García; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Estudio comparativo del perfil electroforético del plasma seminal de semen fresco de *Vicugna pacos* "alpaca" en dos épocas del año y su relación con los parámetros de calidad seminal. Ayacucho, 2023.** presentado por la Bach. Kattery Rossabel CORDERO RUA; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

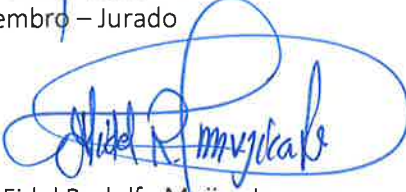
Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Saturnino Martin Tenorio Bautista	18	18	18
Dr. Gilmar Peña Rojas	17	15	16
Blgo. Tomas Yuret Miranda Tomasevich	19	19	19
PROMEDIO			18

La sustentante alcanzó el promedio de 18 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis de la tarde con veinte minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.


Dr. Saturnino Martin Tenorio Bautista
Presidente
Miembro - jurado


Blgo. Tomas Yuret Miranda Tomasevich
Miembro – Jurado


Dr. Gilmar Peña Rojas
Miembro – Jurado


Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua
Miembro - asesor


Mg. Luis Uriel Moscoso García
Secretario docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 014-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Estudio comparativo del perfil electroforético del plasma seminal de semen fresco de *Vicugna pacos* "alpaca" en dos épocas del año y su relación con los parámetros de calidad seminal. Ayacucho, 2023**, por KATTERY ROSSABEL CORDERO RUA; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 13%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 04 de abril de 2025.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología
Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Estudio comparativo del perfil electroforético del plasma seminal de semen fresco de Vicugna pacos “alpaca” en dos épocas del año y su relación con los parámetros de calidad seminal. Ayacucho, 2023

por KATTERY ROSSABEL CORDERO RUA

Fecha de entrega: 19-mar-2025 04:03p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2619408062

Nombre del archivo: C-_CORDERO_RUA-_Kattery-_pregrado-2024_TURNITIN.docx (10.35M)

Total de palabras: 12728

Total de caracteres: 61712

Estudio comparativo del perfil electroforético del plasma seminal de semen fresco de Vicugna pacos "alpaca" en dos épocas del año y su relación con los parámetros de calidad seminal. Ayacucho, 2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%	13%	2%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
2	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	2%
3	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	2%
4	www.tdx.cat Fuente de Internet	2%
5	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	ri.conicet.gov.ar Fuente de Internet	1%
8	ri.agro.uba.ar Fuente de Internet	<1%
9	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
10	academic.oup.com Fuente de Internet	<1%
11	happylibnet.com Fuente de Internet	<1%